

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALAIN VICTOR DE BARROS BARBOZA

DINÂMICA DO rDNA 5S NA EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA DE LORICARIIDAE

CURITIBA

2017

ALAIN VICTOR DE BARROS BARBOZA

DINÂMICA DO rDNA 5S NA EVOLUÇÃO CROMOSSÔMICA DE LORICARIIDAE

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná (UFPR) como parte dos requisitos para obtenção de título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração Genética do Setor de Ciências Biológicas.

Orientador: Prof Dr. Marcelo Ricardo Vicari
Co-orientadora: Prof. Dra. Viviane Nogaroto

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Barros, Alain Victor de

Estrutura e função: o papel do rDNA 5S na evolução cromossômica de
Locariidae (Siluriformes)./ Alain Victor de Barros. – Curitiba, 2017.
75 p.: il. ; 30cm.

Orientador: Marcelo Ricardo Vicari

Co-orientadora: Viviane Nogaroto

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Peixe. 2. Cromossomos. 3. Evolução. I. Título II. Vicari, Marcelo
Ricardo. III. Nogaroto, Viviane. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (20. ed.) 575.1



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
CENTRO POLITÉCNICO - JARDIM DAS AMÉRICAS - CAIXA
POSTAL 19071 - CEP 81531-990 - CTBA, BRASIL 41 3361 1587
PPG-GEN@UFPR.BR



PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de doutorado de ALAIN VICTOR DE BARROS BARBOZA, intitulada: "Dinâmica do rDNA 5S na evolução cromossômica de Loricariidae", após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO.

Curitiba, 31 de março de 2017

Doutora Thaís Saad Szepanski
Membro Titular

Doutora Michelle Orane Schemberger
Membro Titular

Doutor Rafael Bueno Noletto
Membro Titular

Doutor Daniel Pacheco Bruschi
Membro Titular

Doutor Marcelo Ricardo Vicari
Presidente

*Brindo à casa, brindo à vida. Meus
amores, minha família: Mi.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos meus protetores. Agradeço ao meu pai Ogum por me vestir com sua armadura e me deixar empunhar suas armas. Salve Jorge.

A todos os meus familiares, em especial a minha mãe Juliene e minha irmã Isabella, por me amarem e me apoiarem em todas as minhas decisões.

Ao grande amor da minha vida Michele Wolski, por me manter com os pés no chão, me apoiar nas minhas escolhas e aguentar minhas loucuras. Eu sei que sou difícil de lidar mas você nunca desistiu de mim, muito obrigado. Te amo, meu amor.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Ricardo Vicari, agradeço pelos longos anos de amizade, aprendizado, oportunidades e principalmente por confiar em mim quando ninguém mais confiaria. Você é um exemplo de profissional e um ser humano exemplar, tenho orgulho de tê-lo como amigo.

À minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Viviane Nogaroto, pela amizade e pela paciência ao me ensinar inúmeras vezes a mesma coisa. Obrigado a você e ao Marcelo por abrirem sua casa e suas vidas a nós.

Ao Chromosome Biology: Structure & Function LAB- CBSFLab (UEPG), sou grato a todos pelo companheirismo, colaboração na realização de técnicas e pelos momentos de descontração. Principalmente aos meus amigos Rafael Almeida e Paulo Svidinicki pela amizade de longa data e muita discussão científica regada à álcool. Gostaria de agradecer também à Caroline Regina por toda a meiguice e fofurice para com minha pessoa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná e a Universidade Estadual de Ponta Grosso pelo suporte.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida, ao CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a Fundação Araucária, pelo financiamento da pesquisa.

A todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

Say my name.
(HEISENBERG, 2013)

RESUMO

A família Loricariidae detém extensiva variação cariotípica entre espécies de seus gêneros, agrupando o maior e o mais diverso número de espécies da ordem Siluriformes. A variação do número diploide é de $2n = 34$ a $2n = 96$. A caracterização de sequências de DNA presentes em sítios frágeis, auxiliam na compreensão dos extensivos eventos de fusão, fissão, inversão e translocação propostos para a diversificação cariotípica em Loricariidae. Regiões repetitivas de DNA são conhecidas por formar sítios cromossômicos frágeis, os quais apresentam alta flexibilidade e baixa estabilidade do DNA. Neste trabalho, um dos objetivos foi caracterizar sítios frágeis presentes em regiões do rDNA 5S. Para isto, utilizamos a espécie *Ancistrus* sp., a qual apresentou $2n=50$ cromossomos e indicativo de fusão. Foi possível caracterizar duas sequências do rDNA 5S. O denominado rDNA 5S.1 reúne todas as estruturas necessárias para a expressão gênica e a predição da sua estrutura secundária funcional. Já o rDNA 5S.2 não possui sequências necessárias à expressão e a predição da estrutura secundária não condiz com a função ribossômica. A localização cromossômica permitiu verificar inúmeros clusters do rDNA 5S.1 e 5S.2 colocalizados em regiões proximais. Em adição, foram visualizados clusters rDNA 5S.2 em regiões proximais de cromossomos acrocêntricos e metacêntricos. O cluster rDNA 5S.2 presente no par metacêntrico 1 é colocalizado ao sítio telomérico intersticial (ITS). Nossos resultados indicam que o rDNA 5S.2 é pseudogene e seus clusters são sítios frágeis para quebras cromossômicas. Dados citogenéticos para Neoplecostomini relatam para estruturas cariotípicas conservadas de $2n = 54$ cromossomos, pouco conteúdo de heterocromatina e, sentença de rDNAs 45S e 5S. Este estudo também procurou avaliar cromossomicamente três espécies de *Isbrueckerichthys*: *I. calvus*, *I. duseni* e *I. saxicola* de seis diferentes populações. O $2n = 54$ cromossomos foi mantido para as espécies, corroborando com a proposta de conservação para esta subfamília de Loricariidae. A localização sintênica dos rDNAs 5S e 45S foi verificada para as espécies deste gênero, a qual é proposta para ser característica cromossômica basal no grupo. No entanto, em *Isbrueckerichthys* ocorre uma inversão na posição destes sítios rDNAs e evidencia mais um rearranjo cromossômico exclusivo para o gênero. Acúmulos *in cis* do rDNA 5S foram verificados nas três espécies e geraram um heteromorfismo de tamanho deste par cromossômico. Este estudo, ajuda a explicar parte dos mecanismos de diversificação cromossômica em alguns gêneros de Loricariidae.

Palavras-chave: Fusão robertsoniana. Acúmulo *in cis*. Estrutura rRNA 5S. FISH

ABSTRACT

Loricariidae family has a wide karyotype variation among its genus species, grouping the biggest and more diverse number of species of order Siluriformes. The diploid number varies from $2n = 34$ to $2n = 96$. The characterization of DNA sequences within fragile sites, allow us to understand the extensive events of fusion, fission, inversion and translocation in karyotype diversification of Loricariidae. Repetitive DNA regions are known as fragile chromosomal sites which present a high flexibility and low stability. Our focus was characterize fragile sites in 5S rDNA regions. The *Ancistrus* sp. species shows a diploid number of 50 and an indicative robertsonian fusion at chromosomal pair 1. Two sequences of 5S rDNA were identified: rDNA 5S.1 and rDNA 5S.2. The first sequence gathers the necessary structures to gene expression and shows a functional secondary structure prediction. Otherwise, the rDNA 5S.2 sequence does not contain the upstream sequences that are required to expresion, futhermore its structure prediction reveals a nonfunctional ribosomal RNA. The chromosomal mapping revealed several rDNA 5S.1 and rDNA 5S.2 clusters. In addition, the rDNA 5S.2 clusters were found in acrocentric and metacentric chromosomes proximal regions. The pair 1 rDNA 5S.2 cluster is co-located with interstitial telomeric sites (ITS). Our results indicate that its clusters are hotspots to chromosomal breaks. Cytogenetic data to Neoplecostomini describes to conserved karyotype structures $2n = 54$, little heterochromatic content and 45S/5S rDNAs synteny. Our study also evaluated, chromosomally, three species of *Isbrueckerichthys* genus: *I. calvus*, *I. dusei* and *I. saxicola* from six different populations. $2n = 54$ was maintained, corroborating with the conservation proposal to this Loricariidae subfamily. The synteny of 5S and 45S rDNAs was verified to these genus species, which is proposed a basal feature in this group. However, in *Isbrueckerichthys*, occurs an inversion in these rDNAs sites position, evidencing an exclusive rearrangement in this genus. Accumulations *in cis* of 5S rDNA were verified in all three species, generating a size polymorphism of a chromosomic pair. The present study helps to explain part of the chromosome diversification mechanisms in some Loricariidae genus.

Key words: Robertsonian fusion. Accumulation *in cis*. rRNA structure. FISH

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Cariótipo de *Ancistrus* sp. em coloração convencional por Giemsa (a) e bandamento C sequencial (b). Barra = 10 µm.....39

Figura 2. Alinhamentos das sequências rDNA 5S de *Ancistrus* sp. No rDNA 5S.1 (a) são mostradas as sequências TATA-Like, GC box, Citosina -1 na região upstream (NTS); sequências Box A, IE, Box C na região 120 nt transcritos e; sequência poli-T (Pol III termination site) na região downstream (NTS). O rDNA 5S.2 (b) não apresenta as sequências TATA-Like, GC box e Citosina -1 na região upstream. As setas evidenciam as regiões de emparelhamentos do primers. Os SNPs presentes nas sequências estão destacados em cores.....40

Figura 3. Predição da estrutura secundária dos rRNA 5S obtidos de *Ancistrus* sp. Em (a) rRNA 5S.1 evidenciando organização característica em formato de Y; cinco hélices (I-V); sete loops (A-G); hairpins internos e externos e uma dobra. Em (b) rRNA 5S.1 sete hélices (I-VII); sete loops (A-G); e uma dobra.....41

Figura 4. Cariótipos e fibras cromatínicas de *Ancistrus* sp. evidenciando a localização in situ das sequências rDNA 5S.1, rDNA 5S.2, rDNA 18S e TTAGGGn. Em (a) dupla hibridação com sondas rDNA 5S.1 (vermelho) e rDNA 5S.2 (verde); em destaque, par portador da sintenia rDNA 18S (verde) e rDNA 5S (vermelho). Em (b) dupla hibridação com sondas rDNA 5S.2 (verde) e TTAGGGn (vermelho). Em (c) fibra cromatínica com localização das sequências rDNA 5S.1 (vermelho) e rDNA 5S.2 (verde). Em (d) fibra cromatínica com localização das sequências rDNA 5S.2 (verde) e TTAGGGn (vermelho). Barra = 10 µm.....42

Figura 5. Esquema linear mostrando a hipótese de quebra e fusão Robertsoniana para cromossomos portadores do rDNA 5S.2. Em (a) são mostrados dois idiogramas representativos de cromossomos de *Ancistrus* sp. com a localização das sequências TTAGGGn (vermelho) e rDNA 5S.2 (azul) em regiões proximais de cromossomos acrocêntricos. Em (b) organização em

bouquet da prófase I mostrando a aproximação do rDNA 5S.2, prováveis sítios de quebra (linha tracejada) para ocorrência da recombinação não homóloga. Em (c) idiograma representativo do par cromossômico 1 de *Ancistrus* sp. com ITS e rDNA 5S.2 proximal.....43

CAPÍTULO 2

Figura 1. Mapa do estado do Paraná com destaque para as bacias dos rios Tibagi e Ribeira. Riacho da Areia, Ponta Grossa – PR (1), rio Açungui, Campo Largo – PR (2), rio Itaiacoca, Ponta Grossa – PR (3), rio Charqueada, Ortigueira – PR (4), rio Juruba, Apucarana – PR (5) e rio Jacutinga, Londrina – PR (6). (Fonte: <http://www.meioambiente.pr.gov.br/> - Secretaria do Meio Ambiente e Recursos Hídricos - SEMA).....58

Figura 2. Cariótipos de *Isbrueckerichtys* de seis populações das bacias dos rios Ribeira e Tibagi (esquerda). Destaque da hibridação in situ fluorescente, evidenciando os pares portadores das sondas de rDNA 5S (verde) e 18S (vermelho) evidenciando o polimorfismo gerado pelo acúmulo in cis de rDNA 5S.....59

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Dados cariotípicos para espécies de Neoplecostomini.....	56
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

2n - Número diploide

dNTP - Desoxirribonucleotideo trifosfato

DSB - Quebras de fita dupla (Double Strand Breaks)

EI - Elemento intermediário

FISH - Hibridação in situ fluorescente (Fluorescence in situ Hybridization)

ITS - Sítios teloméricos intersticiais (Interstitial Telomeric Sites)

Kb - 1000 bases

LINE - (Long Interspersed Nuclear Elements)

LTR - Longas terminações repetidas (Long Terminal Repeats)

m - Metacêntrico

NF - Número fundamental

NTS - Espaçador não transcrito (Non-transcribed Spacer Sequence)

Pb - Pares de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction)

Rb - Robertsonianas

RCIs - Região controle interna

RON - Região organizadora de nucléolo

rDNA - DNA ribossômico

rRNA - RNA ribossômico

RTEs - Elementos retrotransponíveis

SDs - Segmentos duplicados

SEMA - Secretaria do Meio Ambiente e Recursos Hídricos

SINE - (Short Interspersed Nuclear Elements)

sm - Submetacêntrico

st/a - Subtelocêntrico/acrocêntrico

TE - Elementos transponíveis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 <i>A família Loricariidae</i>	15
1.2 <i>DNA repetitivo</i>	16
1.3 <i>rDNAs</i>	17
2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 <i>Coleta de material biológico e citogenética clássica</i>	20
3.2 <i>Obtenção e caracterização de sequências do rDNA 5S</i>	20
3.3 <i>Análise das sequências de rDNA 5S</i>	21
3.4 <i>Hibridação in situ fluorescente</i>	21
4. RESULTADOS.....	23
4.1 <i>Capítulo 1</i>	23
4.2 <i>Capítulo 2:</i>	23
CAPÍTULO 1	24
Sítios frágeis, telômeros disfuncionais e fusões cromossômicas: Qual o papel do rDNA 5S?	25
CAPÍTULO 2	49
Citogenética comparativa em <i>Isbrueckerichthys</i> (Siluriformes: Loricariidae): caracteres cromossômicos exclusivos	50
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	66
6. REFERÊNCIAS	68
7. ANEXOS	76

1. INTRODUÇÃO

1.1 A família Loricariidae

A família Loricariidae agrupa o maior e o mais diverso número de espécies da ordem Siluriformes (ESCHMEYER; FRICKE, 2016) e seus dados cariotípicos demonstram uma enorme diversidade de caracteres cromossômicos, no entanto, com algumas tendências de evolução cromossômica bem caracterizadas dentro de cada uma de suas subfamílias (ZIEMNICZAK et al., 2012). O grupo apresenta uma vasta distribuição geográfica, estendendo-se por toda a região Neotropical, abrangendo as Américas: Central e do Sul, desde a Costa Rica até a Argentina (REIS et al., 2003). Estes peixes são recobertos por placas dérmicas, motivo pelo qual são chamados popularmente de cascudos; além disso possuem a boca em forma de ventosa na região ventral do corpo. Vivem na região bentônica, alimentando-se de algas do perifíton e de detritos. Alguns exemplares desta família são apreciados como alimentos e as espécies menores utilizadas para fins ornamentais. Podem ficar fora da água por longos períodos, pois além de respirarem pelas brânquias também o fazem pela parede vascularizada do estômago (REIS et al., 2003). Os estudos citogenéticos em Loricariidae demonstram uma enorme diversidade de números diploides, marcadores cromossômicos e genômicos (FERREIRA et al., 2011; BUENO et al., 2012; BLANCO et al., 2013; FAVARATO et al., 2016). A variação do número diploide nos representantes estudados da família é de $2n = 34$ em *Ancistrus cuiabae* (MARIOTTO et al., 2011) a $2n = 96$ em *Hemipsilichthys* sp., citado como *Upsilonodus* sp. (KAVALCO et al., 2005). No entanto, o $2n = 54$ cromossomos foi considerado basal na família (ARTONI; BERTOLLO, 2001). Deste modo, além do número diploide, da pequena quantidade de heterocromatina quase sempre centromérica, a região organizadora de nucléolo (RON) simples em sintenia com o rDNA 5S foram consideradas características basais por estarem presentes em subfamílias conservadas de Loricariidae e no grupo irmão Trichomycteridae (ZIEMNICZAK et al., 2012).

Entre os Loricariidae, todas as espécies do gênero *Ancistrus* estudadas citogeneticamente apresentaram uma variação do $2n$ de 54 para 34 cromossomos, com fusões robertsonianas influenciando fortemente a redução numérica dos cromossomos (MARIOTTO et al., 2011; FAVARATO et al., 2016). Além destas, variações de fórmulas cariotípicas, ocorrências de diferentes tipos de sistemas de cromossomos

sexuais e, diferentes tipos de inversões e translocações foram descritos em *Ancistrus* (MARIOTTO et al., 2011; FAVARATO et al., 2016). Por sua vez, representantes do gênero *Rineloricaria* detém uma variação do 2n de 36 para 70 cromossomos, bem como, uma considerável variação cariotípica (ALVES et al. 2003; KAVALCO et al. 2005). Partindo do pressuposto do 2n primitivo de Loricariidae de 54 cromossomos, para este gênero, são propostos mecanismos de fissão cêntrica para aumento do 2n e de fusão cêntrica para redução numérica (KAVALCO et al. 2005; ROSA et al., 2012; ERRERO-PORTO et al., 2014) e inúmeros eventos de inversões e translocações (Rosa et al., 2012). Em comum, estes dois grupos de Loricariidae (*Ancistrus* e *Rineloricaria*) apresentam ampla variação de 2n e inúmeros rearranjos cromossômicos, como evidenciado pela presença de sítios teloméricos intersticiais (ITS), ampla variação de organizações cariotípicas, além de indícios da participação dos DNAs ribossômicos em uma parcela das quebras e reorganizações cromossômicas (ROSA et al., 2012; ERRERO-PORTO et al., 2014; FAVARATO et al., 2016). Neste aspecto, associar os rearranjos cromossômicos aos sítios frágeis de quebra e tipos de sequências envolvidas podem propiciar o entendimento dos mecanismos que levam a diferenciação cariotípica observada nesta família de peixes.

1.2 *DNA repetitivo*

Uma das principais características do genoma dos eucariotos é a presença de um grande número de DNAs repetitivos (SUMNER, 2003). Essas sequências podem ser agrupadas em dois diferentes tipos: sequências repetitivas *in tandem*, como microsatélites, minissatélites, satélites (satDNA) e famílias multigênicas; e, elementos dispersos, conhecidos como transposons e retrotransposons (CHARLESWORTH, 1994).

As unidades de repetições *in tandem* são geralmente organizadas em clusters, localizadas frequentemente em regiões teloméricas ou pericentroméricas presentes em um ou em vários pares cromossômicos. As sequências repetitivas organizadas *in tandem* têm se mostrado fundamentais em estudos relacionados à evolução cromossômica (MAXON et al., 1983; CHARLESWORTH et al., 1994; VICARI et al., 2010).

Em eucariotos, uma considerável porção do genoma é constituída por heterocromatina constitutiva, a qual na maioria das vezes, é composta por satDNA (CHAVES et al., 2004; JOHN, 1988). O estudo de DNAs satélites em peixes

neotropicais têm se tornado frequente, uma vez que essas sequências podem gerar informações valiosas para estudos microevolutivos, principalmente no caso de sequências espécie-específicas e/ou cromossomo-específicas (UGARKOVIC; PLOHL, 2002; VICARI et al., 2010), assim como em estudos filogenéticos (PONS; GILLESPIE, 2003; KANTEK et al., 2009; SCHEMBERGER et al., 2011).

A sequência telomérica geral dos vertebrados (TTAGGG)_n constitui outra fração repetitiva *in tandem* importante no estudo de evolução cromossômica de peixes neotropicais. Sua análise permite a verificação de rearranjos cromossômicos, principalmente em eventos relacionados a fusões cêntricas, nos quais há a possibilidade de detecção de ITS (BLANCO et al., 2012; ROSA et al., 2012; ERRERO-PORTO et al., 2014; PRIMO et al., 2017).

Os microssatélites consistem de pequenas sequências repetidas *in tandem* que apresentam de 2 a 6 pares de nucleotídeos de comprimento (ZANE et al., 2002). Poucos são os peixes neotropicais com mapeamento físico de microsátélites (HATANAKA et al., 2002; ZIEMNICZAK et al., 2014; PUCCI et al., 2016). Os minissatélites são repetições *in tandem* que apresentam de 10 a 80 pares de nucleotídeos de comprimento (SNUSTAD; SIMMONS, 2013). Estas sequências foram descritas para inúmeras espécies de peixes (GOODIER; DAVIDSON, 1998), contudo o mapeamento cromossômico de minissatélites foi realizado apenas para algumas espécies (PÉREZ et al., 1999; CROLLIUS et al., 2000).

As famílias multigênicas são um conjunto de genes originados por duplicação e variação de algum gene ancestral. Estes genes podem estar clusterizados e localizados em um único cromossomo ou situados em inúmeros sítios no cariótipo.

1.3 rDNAs

Os genes ribossomais compreendem duas famílias gênicas distintas, compostas por repetições organizadas *in tandem*. O rDNA maior (rDNA 45S) é a região responsável pela organização do nucléolo e engloba os genes que codificam os rRNAs 18S, 5,8S e 28S, os quais são sintetizados, processados e parcialmente montados para formar a subunidade ribossômica no nucléolo, e são transcritos pela RNA polimerase I (LONG; DAWID, 1980). O rDNA menor é composto pela família gênica codificante de rRNA 5S, o qual é sintetizado em outro lugar do genoma e entra no nucléolo para participar da montagem da subunidade ribossomal maior (LONG; DAWID, 1980).

O rDNA 5S consiste de uma unidade de transcrição de aproximadamente 120 pb, que é separada da seguinte por uma unidade de espaçador não transcrita (do inglês *non-transcribed spacer sequence* - *NTS*) de tamanho variado. Embora a sequência do gene 5S para rRNA seja altamente conservada, mesmo entre espécies diferentes, os NTS são variáveis, tanto em tamanho quanto em sequência, resultado de inversões, substituições de base, deleções e pseudogenes, possibilitando seu uso em estudos evolutivos (REBORDINOS et al., 2013). As regiões de NTS parecem estar sujeitas a uma evolução mais rápida, sendo consideradas importantes para estudos de organização e evolução das famílias multigênicas.

2. JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A família Loricariidae apresenta uma vasta diversidade cariotípica e algumas (direcionamento - atenuar) de diversificação bem caracterizadas, como rearranjos Robertsonianos conduzidos por sítios cromossômicos frágeis. Entretanto, as sequências de DNA que propiciam esta instabilidade cromossômica em Loricariidae são pouco compreendidas. Neste estudo, o objetivo foi de caracterizar sequências do rDNA 5S, inferir sobre sua funcionalidade e associar sua localização cromossômica para avaliar a atuação destes sítios cromossômicos na origem das fusões cêntricas e consequente redução do número diploide em *Ancistrus* sp.. Do mesmo modo, a lacuna de conhecimento acerca do cariótipo de espécies pertencentes ao gênero *Isbrueckerichthys*, a possibilidade de espécies não descritas e a necessidade de caracteres diagnósticos para a descrição e elucidação sistemática neste gênero, o presente trabalho teve o objetivo de também descrever e comparar os cariótipos de três espécies *Isbrueckerichthys* em seis pontos de amostragem de tributários das bacias dos rios Tibagi e Ribeira. analisando os cariótipos de três espécies do gênero: *I. duseni*, *I. saxicola* e *I. calvus*, buscando caracteres cromossômicos diagnósticos entre elas, entender os processos evolutivos que estiveram envolvidos nos processos de diferenciação cariotípica e auxiliar na citototaxonomia de Neoplecostomini.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta de material biológico e citogenética clássica

Trinta e dois exemplares de *Ancistrus* sp. (Ivaí) foram analisados quanto a citogenética e organização do rDNA 5S e telômero. Ainda, foram analisados dez fêmeas e dez machos, de cada um dos seis locais de amostragem de *Isbrueckerichthys*, sendo: (1) *I. cf. dusei*, riacho da Areia, Ponta Grossa – PR, (2) *I. dusei*, rio Açungui, Campo Largo – PR, (3) *I. cf. dusei*, rio Itaiacoca, Ponta Grossa – PR, (4) *I. cf. calvus*, rio Charqueada, Ortigueira – PR, (5) *I. calvus*, rio Juruba, Apucarana – PR e; (6) *I. saxicola*, rio Jacutinga, Londrina – PR (Figura 1 – capítulo 2).

A captura das espécies na natureza está em conformidade com a autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Licença permanente para coleta de material zoológico ICMBio/SISBIO: 15117-1. Os procedimentos de manuseio e bem estar animal estão de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa e legislação brasileira (Protocolo CEUA: 13/2014). Os cromossomos mitóticos foram obtidos por meio da técnica de “air drying”, descrita por Bertollo et al. (1978) e o bandamento C seguiu o protocolo proposto por Sumner (1972).

3.2 Obtenção e caracterização de sequências do rDNA 5S

A extração de DNA genômico foi realizada a partir do fígado da espécie *Ancistrus* sp., utilizando o protocolo adaptado de Doyle (1990). Sequências do rDNA 5S foram amplificadas por PCR utilizando os primers 5Sa (5'-TACGCCCCGATCTCGTCCGATC-3') e 5Sb (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3') (PENDÁS et al., 1994). As reações de amplificação foram compostas por 40 ng de DNA genômico, 0,2 µM de cada primer, 0,16 mM de dNTPs, 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), 1,5 mM de cloreto de magnésio, 1x tampão da reação (200 mM Tris, pH 8.4, 500 mM KCl). O programa da reação de amplificação consistiu de desnaturação inicial por 5 min a 95 °C, 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 56 °C por 45 s, 72 °C por 2 min e, extensão final a 72 °C por 7 min. Os produtos da amplificação do rDNA 5S de *Ancistrus* sp. foram isolados do gel em agarose a 2% de acordo com o tamanho das bandas obtidas e purificadas utilizando o kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-up

System” (Promega). Os produtos dos diferentes tamanhos de sequências purificados foram ligados ao plasmídeo Pmos “blunt ended PCR cloning Kit” (GE) segundo as instruções do fabricante e transformadas em *Escherichia coli* Dh5 α . Colônias bacterianas recombinantes foram isoladas e posteriormente submetidas a mini-preparação plasmidial. Plasmídeos recombinantes foram enviados para o sequenciamento nucleotídico ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) utilizando os primers para as regiões flanqueadoras do vetor plasmidial.

3.3 *Análise das sequências de rDNA 5S*

As sequências nucleotídicas obtidas foram analisadas usando o BIOEDIT 5.0.9 (HALL, 1999) e Geneious® 7.1.3. Posteriormente foram submetidas a uma análise de identidade utilizando os bancos de dados BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e CENSOR (www.girinst.org/censor/index.php) e submetidas a alinhamentos por similaridade no software on-line MultAlin (CORPET, 1988). As sequências do rDNA 5S obtidas foram submetidas à busca para as regiões TATA-Like, GC box, Box A, elemento intermediário, Box C, poli – T utilizando a base de dados on-line N-Site (Solovyev et al., 2010) e comparadas para estas mesmas regiões propostas para *Arabidopsis thaliana* e *Xenopus laevis* (DOUET; TOURMENTE, 2007). A estrutura 2D dos rRNA 5S obtidos foram obtidas utilizando a ferramenta RNA Fold Geneious® 7.1.3 em temperatura para empacotamento de 22 °C.

3.4 *Hibridação in situ fluorescente*

As sequências de rDNA 5S obtidas neste estudo a partir do DNA genômico de *Ancistrus* sp., juntamente com as sequências do rDNA 18S e sequência (TTAGGG) $_n$ foram localizadas in situ conforme protocolo descrito por Pinkel et al. (1986) e submetidas a Fiber-FISH conforme de Barros et al. (2011). A sequência do rDNA 18S foi obtida a partir do DNA genômico de *Ancistrus* sp., conforme descrito em (SCZEPANSKI et al., 2013) e sequência telomérica geral dos vertebrados (TTAGGG) $_n$ foi obtida segundo Ijdo et al. (1991). As sequências do rDNA 5S, rDNA 18S e a sequência (TTAGGG) $_n$ foram sintetizadas como sondas por PCR, utilizando os nucleotídeos biotina 16 - dUTP ou digoxigenina 11 dUTP (Roche Applied Science). As reações de PCR com primers específicos para cada sequência foi realizada com 20 η g

DNA molde, tampão Taq polimerase 1X = 2 mM MgCl₂, 40 µM dATP, dGTP e dCTP, 28 µM de dTTP, 12 µM de digoxigenina 11- dUTP ou biotina 16 dUTP, 1 µM de cada primer e 1 U de Taq DNA polimerase.

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada em condições de estringência próxima à 87% (2.5 ng/µL de sonda, 50% formamida, 0,5xSSC e 10% sulfato dextrano por 18 h a 37° C). A detecção do sinal de fluorescência para sondas biotiniladas foi realizada usando streptavidin Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) e para sondas com digoxigenina foi utilizado o composto anti digoxigenina rodamina (Roche Applied Science). Os cromossomos foram contracorados com 0.2 µg mL⁻¹ of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) em meio de montagem Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA).

As hibridizações foram analisadas em microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Imager A2 e Câmera Zeiss Axio Cam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 mega pixels acoplado ao software ZEISS pro 2011 (Carl Zeiss®). As imagens foram selecionadas para organizar os cariótipos, onde os cromossomos foram recortados usando o software Adobe Photoshop, versão CS6, e organizados em pares de homólogos em classes e ordem decrescente de tamanho. Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) de acordo com Levan et al. (1964).

4. RESULTADOS

Os resultados da tese estão organizados em capítulos referentes aos artigos científicos (já formatados nas normas das revistas):

4.1 *Capítulo 1: Sítios frágeis, telômeros disfuncionais e fusões cromossômicas: Qual o papel do rDNA 5S?*

4.2 *Capítulo 2: Citogenética comparativa em *Isbrueckerichthys* (Siluriformes: Loricariidae): caracteres cromossômicos exclusivos.*

CAPÍTULO 1

Sítios frágeis, telômeros disfuncionais e fusões cromossômicas: Qual o papel do rDNA 5S?

RESUMO

Regiões repetitivas de DNA são conhecidas por formar sítios cromossômicos frágeis, os quais apresentam alta flexibilidade e baixa estabilidade do DNA. Neste trabalho, o objetivo foi caracterizar sítios frágeis presentes em regiões do rDNA 5S. Para isto, utilizamos a espécie *Ancistrus* sp., a qual apresentou $2n=50$ cromossomos e indicativo de fusão Robertsoniana na origem do par cromossômico 1. Foi possível caracterizar duas sequências do rDNA 5S. O denominado rDNA 5S.1 de *Ancistrus* sp. reúne todas as estruturas necessárias para a expressão gênica e a predição da estrutura secundária funcional do rRNA 5S. Já o rDNA 5S.2 não possui sequências *upstream* necessárias à expressão pela RNA polimerase III e a predição da estrutura secundária não condiz com a função ribossômica. A localização cromossômica permitiu verificar inúmeros clusters do rDNA 5S.1 e rDNA 5S.2 colocalizados em regiões proximais. Em adição, foram visualizados clusters rDNA 5S.2 em regiões proximais de cromossomos acrocêntricos e metacêntricos. O cluster rDNA 5S.2 presente no par metacêntrico 1 é colocalizado ao sítio telomérico intersticial (ITS). Nossos resultados indicam que o rDNA 5S.2 é pseudogene e seus clusters são sítios frágeis para quebras cromossômicas. Durante a organização em bouquet da prófase I, *double strand break* (DSB) nos sítios rDNA 5S.2 em localização proximal de cromossomos acrocêntricos propiciaria mecanismos de reparo por recombinação homóloga e não homóloga com consequente possibilidade da ocorrência de fusões Robertsonianas. Ainda, os ITS formados proporcionam sítios cromossômicos instáveis sujeitos a recombinação telomérica via shelterin protein TRF2 e uma série de ciclos de quebra e fusão. Neste estudo, propomos que sequências derivadas do rDNA 5S atuam como sítios cromossômicos frágeis com participação em uma parcela dos rearranjos cromossômicos de Loricariidae.

Palavras-chave: fusão robertsoniana, instabilidade telomérica, estrutura rRNA 5S, pseudogene, FISH

INTRODUÇÃO

A ocorrência dos rearranjos cromossômicos é associada a quebras de DNA em sítios ricos em sequências repetitivas (KIDWELL; LISCH, 1997; KIDWELL, 2002; BADAIEVA et al., 2007; BRUSCHI et al., 2014) com efeitos na plasticidade cromossômica e reflexos na especiação (KIDWELL; LISCH, 1997; KIDWELL, 2002; ZIEMNICZAK et al., 2014; SCHEMBERGER et al., 2016). Esta predisposição à instabilidade de certas regiões genômicas foram formalizadas como *fragile breakage model* (PEVZNER; TESLER, 2003). Associados a este modelo a propensão à quebras de sítios teloméricos intersticiais (ITS) e a disfunção telomérica também são utilizados para explicar a plasticidade cromossômica (KILBURN et al., 2001; PERRY et al., 2004; BOLZÁN, 2012; SLIJEPCEVIC, 2016). Especialmente em mamíferos, sequências LTR, LINE, SINE foram determinadas em sítios frágeis, os quais são reconhecidos por formar uma região do DNA de alta flexibilidade e baixa estabilidade (EICHLER; SANKOFF, 2003; KEHRER-SAWATZKI; COOPER, 2008).

O telômero tem como função principal dar estabilidade as pontas dos cromossomos lineares. Isso é conhecido por função *capping*, a qual previne que pontas quebradas de DNA sejam interceptadas por mecanismos de reparo (de LANGE, 2004). A outra função dos telômeros é resolver o problema de replicação das pontas (de LANGE, 2015). Algumas vezes, vestígios de sequências TTAGGGn são visualizadas em sítios intersticiais, a estas ITS são atribuídos pontos da ocorrência de rearranjos cromossômicos (MEYNE et al., 1990). ITS são sequências propícias as quebras cromossômicas (SLIJEPCEVIC et al., 1996) e estudos demonstraram que danos ao DNA telomérico são irreparáveis e causam uma persistente ativação da resposta ao dano no DNA (FUMAGALLI et al., 2012) ou permanecem como sítios frágeis (SFEIR et al., 2009). Isso sugere que ambos ITS e sequências teloméricas terminais são naturalmente propensas à quebra, levando à uma plasticidade cromossômica. (SLIJEPCEVIC, 2016).

Associado aos elementos transponíveis, as repetições *in tandem*, em particular os rDNAs, foram visualizados junto aos pontos de quebras cromossômicas em regiões do braço curto de inúmeros cromossomos acrocêntricos, propiciando substrato para mecanismo de recombinação não-homóloga e rearranjos cromossômicos (FROENICKE; LYONS, 2008; CAZAUX et al., 2011). As famílias de rDNA têm ampla atividade gênica e, devido a esta característica, organizam um sítio cromossômico com filamentos da cromatina descondensados (HUANG et al., 2008).

Regiões da cromatina descondensadas em terminais cromossômicos podem originar *end-to-end fusions*, mesmo em condições de sítios teloméricos longos (SLIJEPCEVIC et al., 1997).

Eucariotos superiores possuem milhares de cópias de genes de rRNA, contudo, em alguns casos, apenas uma fração destes rRNA estão ativos (ROGERS; BENDICH, 1987; DOUET; TOURMENTE, 2007). É conhecido também que em inúmeros eucariotos, os genes de *rRNA 5S* estão organizados em dois clusters de repetição *in tandem* separados, os quais são transcritos pela RNA polimerase III (DUCROT et al., 2006), um destes, inativo na maioria das etapas do desenvolvimento (PETERSON et al., 1980; WOLFFE, 1994). Quanto a estrutura, cada unidade do rDNA 5S possui uma região altamente conservada de 120 pb separada da próxima unidade por um espaçador não transcrito (NTS) (LONG; DAWID, 1980). O RNA 5S é o menor rRNA, conta com 120 nt, uma massa molecular de 40 KDa e, sua estrutura secundária é organizada em cinco hélices (KENNETH et al., 1981; CIGANDA; WILLIAMS, 2011).

O gênero *Ancistrus* é extremamente diverso, com número superior a 100 espécies válidas (FERRARIS, 2007) e apresentam uma ampla variação de número e fórmulas cromossômicas, com tendência de redução do $2n$, variando de 34 para 54 cromossomos (MARIOTTO et al., 2011). Neste grupo, a fusão cêntrica é o rearranjo cromossômico que leva à redução do número diploide em espécies do gênero (ALVES et al., 2003; MARIOTTO et al., 2011). Entretanto, as sequências de DNA que propiciam esta instabilidade cromossômica em Loricariidae são precariamente compreendidas.

Neste estudo, o objetivo foi de caracterizar sequências do rDNA 5S, inferir sobre sua funcionalidade e associar sua localização cromossômica para avaliar a atuação destes sítios cromossômicos na origem das fusões cêntricas e consequente redução do número diploide em *Ancistrus* sp.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de material biológico e citogenética clássica

Trinta e dois exemplares de *Ancistrus* sp. foram analisados quanto a citogenética e organização do rDNA 5S e telômero. A captura das espécies na natureza está em conformidade com a autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Licença permanente para coleta de material zoológico ICMBio/SISBIO: 15117-1. Os procedimentos de manuseio e bem estar animal estão de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa e legislação brasileira (Protocolo CEUA: 13/2014). Os cromossomos mitóticos foram obtidos por meio da técnica de “air drying”, descrita por Bertollo et al. (1978) e o bandamento C seguiu o protocolo proposto por Sumner (1972).

Obtenção e caracterização de sequências do rDNA 5S

A extração de DNA genômico foi realizada a partir do fígado da espécie *Ancistrus* sp., utilizando o protocolo adaptado de Doyle (1990). Sequências do rDNA 5S foram amplificadas por PCR utilizando os primers 5Sa (5'-TACGCCCCGATCTCGTCCGATC-3') e 5Sb (5'-CAGGCTGGTATGGCCGTAAGC-3') (PENDÁS et al., 1994). As reações de amplificação foram compostas por 40 ng de DNA genômico, 0,2 µM de cada primer, 0,16 mM de dNTPs, 1U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen®), 1,5 mM de cloreto de magnésio, 1x tampão da reação (200 mM Tris, pH 8.4, 500 mM KCl). O programa da reação de amplificação consistiu de desnaturação inicial por 5 min a 95 °C, 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 56 °C por 45 s, 72 °C por 2 min e, extensão final a 72 °C por 7 min. Os produtos da amplificação do rDNA 5S de *Ancistrus* sp. foram isolados do gel em agarose a 2% de acordo com o tamanho das bandas obtidas e purificadas utilizando o kit “Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System” (Promega). Os produtos dos diferentes tamanhos de sequências purificados foram ligados ao plasmídeo Pmos “blunt ended PCR cloning Kit” (GE) segundo as instruções do fabricante e transformadas em *Escherichia coli* Dh5α. Colônias bacterianas recombinantes foram isoladas e posteriormente submetidas a mini-preparação plasmidial. Plasmídeos recombinantes foram enviados para o

sequenciamento nucleotídico ABI-Prism 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) utilizando os primers para as regiões flanqueadoras do vetor plasmidial.

Análise das sequências de rDNA 5S

As sequências nucleotídicas obtidas foram analisadas usando o BIOEDIT 5.0.9 (HALL, 1999) e Geneious® 7.1.3. Posteriormente foram submetidas a uma análise de identidade utilizando os bancos de dados BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e CENSOR (www.girinst.org/censor/index.php) e submetidas a alinhamentos por similaridade no software on-line MultAlin (CORPET, 1988). As sequências do rDNA 5S obtidas foram submetidas à busca para as regiões TATA-Like, GC box, Box A, elemento intermediário, Box C, poli – T utilizando a base de dados on-line N-Site (Solovyev et al., 2010) e comparadas para estas mesmas regiões propostas para *Arabidopsis thaliana* e *Xenopus laevis* (DOUET; TOURMENTE, 2007). A estrutura 2D dos rRNA 5S obtidos foram obtidas utilizando a ferramenta *RNA Fold* Geneious® 7.1.3 em temperatura para empacotamento de 22 °C.

Hibridação in situ fluorescente

As sequências de rDNA 5S obtidas neste estudo a partir do DNA genômico de *Ancistrus* sp., juntamente com as sequências do rDNA 18S e sequência (TTAGGG)_n foram localizadas *in situ* conforme protocolo descrito por Pinkel et al. (1986) e submetidas a Fiber-FISH conforme de Barros et al. (2011). A sequência do rDNA 18S foi obtida a partir do DNA genômico de *Ancistrus* sp., conforme descrito em (SCZEPANSKI et al., 2013) e sequência telomérica geral dos vertebrados (TTAGGG)_n foi obtida segundo Ijdo et al. (1991). As sequências do rDNA 5S, rDNA 18S e a sequência (TTAGGG)_n foram sintetizadas como sondas por PCR, utilizando os nucleotídeos biotina 16 - dUTP ou digoxigenina 11 dUTP (Roche Applied Science). As reações de PCR com *primers* específicos para cada sequência foi realizada com 20 ng DNA molde, tampão *Taq* polimerase 1X = 2 mM MgCl₂, 40 μM dATP, dGTP e dCTP, 28 μM de dTTP, 12 μM de digoxigenina 11- dUTP ou biotina 16 dUTP, 1 μM de cada primer e 1 U de *Taq* DNA polimerase.

A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada em condições de estrringência próxima à 87% (2.5 ng/μL de sonda, 50% formamida, 0,5xSSC e 10%

sulfato dextrano por 18 h a 37° C). A detecção do sinal de fluorescência para sondas biotiniladas foi realizada usando streptavidin Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) e para sondas com digoxigenina foi utilizado o composto anti digoxigenina rodamina (Roche Applied Science). Os cromossomos foram contracorados com 0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) em meio de montagem Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA).

As hibridizações foram analisadas em microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Imager A2 e Câmera Zeiss Axio Cam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 mega pixels acoplado ao software ZEISS pro 2011 (Carl Zeiss®). As imagens foram selecionadas para organizar os cariótipos, onde os cromossomos foram recortados usando o software Adobe Photoshop, versão CS6, e organizados em pares de homólogos em classes e ordem decrescente de tamanho. Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) de acordo com Levan et al. (1964).

RESULTADOS

Citogenética convencional

O número diploide em *Ancistrus* sp. foi de 50 cromossomos em todos os indivíduos analisados, com $NF = 88$ e fórmula cariotípica de $20m + 12sm + 6st + 12a$, sem a presença de heteromorfismo de cromossomos sexuais (Figura 1a). Foram observados pequenos blocos heterocromáticos na região pericentromérica da maioria dos cromossomos, além do braço curto do par cromossômico 13 totalmente heterocromático (Figura 1b). O par cromossômico 13 apresentou um heteromorfismo de tamanho (Figura 1).

Caracterização das sequências rDNA 5S

Dois tipos de sequências de rDNA 5S foram recuperadas a partir do sequenciamento de 20 clones dos produtos de PCR em *Ancistrus* sp., as quais apresentaram identidade ao rDNA 5S de diferentes ordens de Ostariophysi. A primeira sequência, aqui denominada de rDNA 5S.1, apresentou um tamanho de 203 pb e identidade média de 98% com a região do gene ribossomal 5S das seguintes espécies: *Salmo trutta*, *Solea Solea* e *Xiphias gladius* (GenBank: HQ681118.1, HQ681116.1 e HQ681114.1, respectivamente). Esta sequência detém 120 pb de fase codificadora, NTS de 83 pb, promotor interno composto de box A (50 – 65 pb), elemento intermediário (IE), box C (81 – 98 pb), um poli T cluster (*downstream* à região transcrita), uma região TATA-like (- 31 a – 28 pb), um GC box (-13 a – 9 pb) e a Citosina -1 (Figura 2a). A segunda sequência, denominada de rDNA 5S.2, variou em tamanho de 301 a 315 pb e apresentou identidade média de 89% com a região do gene ribossomal 5S de *Brycon cephalus*, 88% em *Cyprinus carpio* e 92% em *Leporinus octofasciatus* (GenBank: AF250528.1, KM359669.1 e DQ009530.1, respectivamente). O rDNA 5S.2 detém fase codificadora correspondente a 117 – 120 pb, NTS 184 - 197 pb, promotor interno composto de box A (50 – 65 pb), elemento intermediário (IE), box C (81 – 98 pb), um poli T cluster (*downstream* à região transcrita) (Figura 2b). O rDNA 5S.2 não possui região TATA-like, GC box e Citosina -1 quando comparado a sequência 5S.1 (Figura 2b). Na base de dados Censor o rDNA 5S.2 apresentou identidade de 85% com a sequência *Carp repetitive DNA homologous to 5S rRNA* (RP5S).

Predição da estrutura secundária

A predição da estrutura secundária para o *rRNA 5S.1* demonstrou energia livre de -67,08, uma organização característica em formato de Y, composta por cinco hélices, sete *loops*, dois *hairpins* internos e dois externos e uma dobra (Figura 3a). Por sua vez, a predição para a estrutura secundária do *rRNA 5S.2* demonstrou energia livre de -56,19, uma organização com sete hélices e sete *loops* (Figura 3b).

Localização in situ

A localização *in situ* da sequência rDNA 5S.1 evidenciou clusters na região subterminal do braço longo do cromossomo 4, região subterminal do braço curto dos cromossomos 13, 15 e 18, e região proximal do braço longo do cromossomo 19 (Figura 4a). O rDNA 18S foi localizado sintênico ao rDNA 5S no cromossomo 13 (Figura 4, box). A sequência rDNA 5S.2 apresentou sinais colocalizados ao rDNA 5S.1 nos cromossomos 13, 15, 18 e 19, além de pequenas marcações proximais nos cromossomos 1 e 23 (Figura 4a). Os cromossomos 13, 18 e 19 apresentam quantidades similares de rDNA 5S.1 e rDNA 5S.2, enquanto o cromossomo 15 apresenta maior quantidade do rDNA 5S.2 (Figura 4a). A dupla hibridação com sonda TTAGGGn e rDNA 5S.2 evidenciou ITS (*interstitial telomeric sites*) na região proximal do cromossomo 1, colocalizado ao rDNA 5S.2, além dos sítios TTAGGGn nos terminais cromossômicos (Figura 4b). A *fiber fish* com sonda rDNA 5S.1 e rDNA 5S.2 (Figura 4c) e rDNA 5S.2 e TTAGGGn (Figura 4d) evidenciaram sinais intercalares.

DISCUSSÃO

Todos os tipos de rearranjos cromossômicos são encontrados ao estudar Loricariidae mas, os rearranjos do tipo fusão e fissão cêntrica são os responsáveis pela ampla variação do $2n$ (ARTONI; BERTOLLO, 2001; BUENO et al., 2012). Em *Ancistrus* (Ancistrini) a tendência de diversificação cariotípica inclui rearranjos de translocação e inversão, translocação e fusão cêntrica, que leva à redução numérica a partir do $2n=54$ cromossomos considerado ancestral (ARTONI; BERTOLLO, 2001). A espécie *Ancistrus* sp. aqui estudada ($2n=50$) detém resquícios cromossômicos que indicam a redução do $2n$ ancestral. As sequências de DNA avaliadas e suas localizações cromossômicas permitem determinar o tipo variante rDNA 5S.2 como *hotspot* para quebra e origem da fusão cromossômica.

A transcrição do rDNA 5S pela RNA polimerase III dá origem a um *rRNA* 5S de 120 nt (CLOIX et al., 2002). O conjunto de resultados apresentados demonstram que o rDNA 5.1 de *Ancistrus* sp. é funcional por apresentar todas as regiões consenso necessárias para o reconhecimento e transcrição pela RNA polimerase III. Isto consiste de um box A, do elemento intermediário, do box C e, como demonstrado em inúmeros organismos, as unidades funcionais apresentam uma curta sequência TATA-Like em aproximadamente - 30, uma região GC rica em -13, a citosina -1 e, quatro ou mais timinas necessárias para sinal de término da transcrição (VENKATESWARLU et al., 1991; CLOIX et al., 2000; PAULE; WHITE, 2000). Além da organização molecular do rDNA 5S.1, a predição da estrutura secundária demonstra organização funcional para o *rRNA* 5S.1 quando comparada com várias fontes de eucariotos (LUEHRSEN et al., 1981; CIGANDA; WILLIAMS, 2011).

A análise detalhada das sequências rDNA 5S.1 de *Ancistrus* sp. demonstram pequenas substituições de base. Em outros organismos foi demonstrado que substituições de uma ou duas bases nas sequências rDNA 5S diferem quanto a expressão do *major 5S RNA* (aquele expresso em todos tecidos e em maior quantidade), daqueles que são inativos em determinadas fases do desenvolvimento e tecidos (CHEN et al., 1984; MATHIEU et al., 2003 ; DOUET ; TOURMENTE, 2007). Em *Arabidopsis thaliana* e *Xenopus laevis* a transcrição dos genes de *rRNA* 5S presentes em regiões heterocromáticas é epigeneticamente controlada e envolve mecanismos de metilação de sequências CpG e desacetilação de histonas (DOUET; TOURMENTE, 2007). O cluster rDNA 5S considerado ancestral para Loricariidae é sintênico ao rDNA 45S e presente

em lóco heterocromático (ZIEMNICZAK et al., 2012). Em *Ancistrus* sp. o rDNA 5S.1 está localizado em regiões heterocromáticas e sintênico ao rDNA 45S. É conhecido o envolvimento da estrutura da cromatina na regulação da atividade gênica do rDNA 5S (PONTES et al., 2006) e sítios metilados dos rDNAs 5S e 45S podem ser alvos diretos ou indiretos para RNA polimerase IV (HERR et al., 2005). Estas informações apontam para a provável ocorrência de regulação gênica para sequências *rRNA* 5S principal e, aquelas que podem estar inativas no desenvolvimento e/ou diferentes tecidos em *Ancistrus* sp.

A comparação do rDNA 5S.1 ao rDNA 5S.2 de *Ancistrus* sp. demonstram uma provável inatividade gênica e funcional para o rDNA 5S.2. A sequência correspondente aos 120 nt transcritos no rDNA 5S.2 apresenta substituições e deleções de base, além do NTS maior e com inúmeras mutações de um único nucleotídeo (SNP). A ausência das sequências TATA-Like e GC são conhecidas por inatividade gênica aos rDNAs 5S (NELSON et al., 1998; CLOIX et al., 2002). As ausências das sequências *upstream*, especialmente a TATA-Like, indicam ausência transcricional para o rDNA 5S.2. Ainda, a predição da estrutura secundária para as sequências *rRNA* 5S.2 não formam a estrutura característica de Y, com cinco *loops* e alças necessárias para a função ribossômica (CIGANDA; WILLIAMS, 2011). Soma-se ao fato a menor identidade genética ao rDNA 5S de outros organismos apresentada pela sequência rDNA 5S.2 de *Ancistrus* sp., além desta sequência apresentar similaridade a sequência RP5S de carpa, conhecida por ser um DNA repetitivo derivado do rDNA 5S (HUANG et al., 1993).

Em outros estudos em carpa, foram demonstradas ocorrências de sequências relacionadas ao rDNA 5S com poucas modificações na estrutura codificadora, porém com indicativos de inatividade (MURAKAMI; FUJITANI, 1998). Estas sequências derivadas de rDNA 5S de carpa foram propostas a ser pseudogenes ou, um *short interspaced nuclear element* (SINE) derivado de rDNA 5S devido a ocorrência de uma região rica em adeninas finalizando com poli A (MURAKAMI; FUJITANI, 1998). A sequência rDNA 5S.2 de *Ancistrus* sp. possui similaridade a sequências de DNA repetitivo de carpa, porém não apresentou em sua estrutura regiões ricas em adeninas para a retrotransposição, sugerindo ter origem por pseudogene. Sua localização em clusters cromossômicos banda C positivos também indicam um provável processo destes pseudogenes rDNA 5S.2 em originar um DNA satélite, como observado para outros peixes (MARTINS et al., 2006; FERREIRA et al., 2007).

No gênero *Mus*, quebras cromossômicas ocorrem nas proximidades do rDNA 45S e, em inúmeros casos, estão envolvidas em fusão Robertsoniana e presença de sequências rDNA em regiões pericentroméricas (CAZAUX et al., 2011). Em humanos e em plantas a presença de sítios cromossômicos frágeis também estão associados a regiões descondesadas de DNA, tais como o rDNA (RICHARDS, 2001; HUANG et al., 2008). Em Loricariidae, a localização cromossômica de sítios rDNA 5S em regiões colocalizadas a ITS já demonstraram o envolvimento de múltiplos clusters rDNA em rearranjos cromossômicos nas subfamílias Loricariinae (ROSA et al., 2012) e Ancistrinae (FAVARATO et al., 2016). Dados de localização *in situ* demonstram outras espécies com redução numérica e rDNA 5S proximal (MARIOTTO et al., 2011), indicando que estas sequências podem atuar como sítios frágeis na família. Em outra via, é possível verificar que a maioria das espécies que mantém $2n=54$ cromossomos possuem apenas um cluster rDNA 5S e um cluster rDNA 45S (ZIEMNICZAK et al., 2012).

Em nossa hipótese, o rDNA 5S.2 de *Ancistrus* sp. tem origem pseudogene, uma vez que apresenta mutações indicativas de inatividade e foi localizado intercalar em todos os cromossomos que apresentam a cópia rDNA 5S.1. O rDNA 5S.2 está mais amplamente distribuído pelo genoma, e pode estar em processo de transformação em DNA satélite. O nosso conjunto de dados propõem que sítios pseudogenes rDNA 5S são *hotspots* para quebra cromossômica e, estão envolvidos em eventos de fusão Robertsoniana em Loricariidae com mecanismo similar ao proposto para a atuação do rDNA 45S e regiões adjacentes na diversificação cromossômica de espécies do gênero *Mus* e *Lolium* (HUANG et al., 2008; CAZAUX et al., 2011). Inúmeras características dos sítios de rDNA contribuem para esta proposição. Sítios de estrutura de cromatina compacta (heterochromatin-like) contribuem para origem de sítios frágeis (HUANG et al., 2008). Os sítios frágeis são encontrados em sítios de DNA preferenciais de recombinação e amplificação gênica (DATSON; MURRAY et al., 2006). Quebras nestas regiões podem ser alvos do reparo pelo mecanismo de recombinação homóloga ou conversão gênica e, na ocorrência de múltiplos clusters, por recombinação não homóloga (STULTS et al., 2008; CAZAUX et al., 2011) e sítios frágeis podem ser decorrentes da alteração da estrutura do DNA ou da estagnação da duplicação do DNA (GERICKE, 1999).

No genoma de *Ancistrus* sp. o rDNA está localizado em região subterminal do braço curto ou proximal do braço longo (Figura 5). Durante o início da prófase, os

cromossomos migram no núcleo e adquirem uma configuração em que todos os telômeros se ligam a membrana nuclear, conhecida como orientação de *bouquet* (DERNBURG et al., 1995). A distribuição dos sítios rDNA 5S em região proximal de cromossomos acrocêntricos e a organização em bouquet facilita a proximidade dos sítios e, na ocorrência de DSBs, propiciaria condições para a recombinação não homóloga (Figura 5), onde sequências similares em cromossomos não homólogos (tais como as sequências dos genes rRNA adjacentes as regiões centroméricas) poderiam promover a evolução em concerto (HIRAI et al., 1999). Neste contexto, por ser um sítio frágil, quebras (*double-strand breaks* - DSBs) nas regiões do rDNA 5S.2 tornariam os cromossomos acrocêntricos sem a alça telomérica instáveis e, desta forma, suscetíveis para fusão Robertsoniana (Figura 5), com provável atuação de mecanismos de reparo por recombinação. As evidências de resquícios de rDNA 5S.2 intercalares a sequências TTAGGGn na região pericentromérica do par cromossômico 1 fortalecem a atuação do rDNA 5S nos mecanismos de fusão Robertsoniana em Loricariidae. A associação destas sequências a elementos transponíveis (TEs) não pode ser descartada, embora estes TEs não tenha sido encontrados na análise das sequências de rDNA 5S deste estudo.

A presença de sítios ITS também é conhecida por gerar instabilidade cromossômica e sítios frágeis (PERRY et al., 2004; BOLZÁN, 2012; AKSENOVA et al., 2013). Os ITS são descritos pontos quentes de recombinação devido a *T-loops* podem interagir com regiões não teloméricas distantes por meio da proteína *shelterin* TRF2 (WOOD et al., 2014) e são conhecidos por causar uma série de ciclos de pontes de quebra e fusão (BOLZÁN, 2012; SLIJEPCEVIC, 2016). Estes mecanismos são conhecidos por formar outros tipos de rearranjos cromossômicos (DAY et al., 1998; AKSENOVA et al., 2013). Nesta via, a ocorrência das fusões Robertsonianas e a presença dos ITS poderiam explicar também os extensivos eventos de inversão e translocação propostos para a diversificação cariotípica de *Ancistrus* (MARIOTTO et al., 2011).

Como já mencionado, outros grupos de Loricariidae também apresentam fortes evidências da participação do rDNA 5S em região proximal do braço curto de cromossomos acrocêntricos como sítios frágeis para a quebra e fusão Robertsoniana (ROSA et al., 2012; FAVARATO et al., 2016). A caracterização das sequências de DNA que envolvem a região pericentromérica destes cromossomos fusionados, assim como do pseudogene rDNA 5S.2 deste estudo podem explicar parte da extensa variação do 2n encontrada em Loricariidae.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Ministério do Meio Ambiente / Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (IBAMA / ICMBio / SISBIO No. 15117) pela autorização para recolher as amostras biológicas. Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Secretaria de Ciência e Tecnologia do Estado do Paraná (SETI-PR) e Fundação Araucária de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Estado do Paraná (Fundação Araucária).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aksenova AY, Greenwell PW, Dominska M, Shishkin AA, Kim JC, Petes TD, Mirkin SM (2013) Genome rearrangements caused by interstitial telomeric sequences in yeast. *P Natl Acad Sci* 110: 19866-19871
- Alves AL, Oliveira C, Foresti F (2003) Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). *Caryologia* 56: 57-63
- Artori RF, Bertollo LAC (1999) Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). *Genetica*, 106: 209-214
- Artori RF, Bertollo LAC (2001) Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas* 134: 201-210
- Badaeva ED, Dedkova OS, Gay G, Pukhalskyi VA, Zelenin AV, Bernard S, Bernard M (2007) Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution. *Genome* 50: 907-926
- Barros AV, Sczepanski TS, Cabrero J, Camacho JPM, Vicari MR, Artori RF (2011) Fiber FISH reveals different patterns of high-resolution physical mapping for repetitive DNA in fish. *Aquaculture* 322: 47-50
- Beridze T (1986) Satellite DNA. Springer, Berlin
- Bertollo LAC, Takahashi CS, Moreira Filho O (1978) Cytotaxonomic consideration on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Braz J Genet* 1: 103-120
- Bolzán AD (2011) Chromosomal aberrations involving telomeres and interstitial telomeric sequences. *Mutagenesis*: ger052
- Bruschi DP, Rivera M, Lima AP, Zúñiga AB, Recco-Pimentel SM (2014) Interstitial Telomeric Sequences (ITS) and major rDNA mapping reveal insights into the karyotypical evolution of Neotropical leaf frogs species (Phyllomedusa, Hylidae, Anura). *Mol Cytogenet* 7: 22
- Bueno V, Zawadzki CH, Margarido VP (2012) Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. *Rev Fish Biol Fisher* 22: 241-250
- Cazaux B, Catalan J, Veyrunes F, Douzery EJ, Britton-Davidian J (2011) Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots? A case study in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae). *BMC Evol Biol* 11: 1
- Charlesworth B, Sniegowski P, Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371: 215-220

- Chen MW, Anné J, Volckaert G, Huysmans E, Vandenberghe A, De Wachter R (1984) The nucleotide sequences of the 5 S rRNAs of seven molds and a yeast and their use in studying ascomycete phylogeny. *Nucleic Acids Res* 12 : 4881-4892
- Ciganda M, Williams N (2011) Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 2: 523-533
- Cloix C, Tutois S, Mathieu O, Cuvillier C, Espagnol MC, Picard G, Tourmente S (2000) Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms. *Genome Res* 10: 679-690
- Cloix C, Tutois S, Yukawa Y, Mathieu O, Cuvillier C, Espagnol MC, Tourmente S (2002) Analysis of the 5S RNA pool in *Arabidopsis thaliana*: RNAs are heterogeneous and only two of the genomic 5S loci produce mature 5S RNA. *Genome Res* 12: 132-144
- Corpet F (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* 16: 10881-10890
- Datson PM, Murray BG (2006) Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesia*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism? *Chromosome Res* 14: 845-857.
- Day JP, Limoli CL, Morgan WF (1998) Recombination involving interstitial telomere repeat-like sequences promotes chromosomal instability in Chinese hamster cells. *Carcinogenesis* 19: 259-265
- De Oliveira RR, Souza IL, Venere PC (2006). Karyotype description of three species of Loricariidae (Siluriformes) and occurrence of the ZZ/ZW sexual system in *Hemiancistrus spilomma* Cardoso & Lucinda, 2003. *Neotrop Ichthyol* 4: 93-97
- Dernburg AF, Sedat JW, Cande WZ, Bass HW (1995) Cytology of Telomeres. *Cold Spring Harbor M* 29: 295-338
- Douet J, Tourmente S (2007) Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*. *Heredity* 99: 5-13
- Doyle JJ (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15
- Ducrot C, Lefebvre O, Landrieux E, Guirouilh-Barbat J, Sentenac A, Acker J (2006) Reconstitution of the yeast RNA polymerase III transcription system with all recombinant factors. *J Biol Chem* 281: 11685-11692
- Errero-Porto F, de Rossi Vieira MM, Barbosa LM, Borin-Carvalho LA, Vicari MR, de Brito Portela-Castro AL, Martins-Santos IC (2014) Chromosomal Polymorphism in *Rineloricaria lanceolata* Günther, 1868 (Loricariidae: Loricariinae) of the Paraguay Basin (Mato Grosso do Sul, Brazil): Evidence of Fusions and Their Consequences in the Population. *Zebrafish* 11: 318-324

- Eschmeyer WN, Fricke R (2015) Catalog of Fishes electronic version. <http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp> Accessed 15 May 2016
- Favarato RM, da Silva M, de Oliveira RR, Artoni RF, Feldberg E, Matoso DA (2016) Cytogenetic Diversity and the Evolutionary Dynamics of rDNA Genes and Telomeric Sequences in the *Ancistrus* Genus (Loricariidae: Ancistrini). *Zebrafish* 13: 103-111
- Ferraris CJ (2007) Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. Magnolia Press, Auckland
- Ferreira IA, Oliveira C, Venere PC, Galetti Jr PM, Martins C (2007) 5S rDNA variation and its phylogenetic inference in the genus *Leporinus* (Characiformes: Anostomidae). *Genetica* 129: 253-257
- Martins C (2007). Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. In: Pisano, E.; Ozouf-Costaz, C.; Foresti, F.; Kapoor, B.G. (eds). *Fish Cytogenetics*. Science Publisher, Inc., USA
- Murakami M, Fujitani H (1998) Characterization of repetitive DNA sequences carrying 5S rDNA of the triploid gimbuna (Japanese silver crucian carp, *Carassius auratus langsdorfi*). *Genes Genet Syst* 73: 9-20
- Gericke GS (1999) Chromosomal fragility may be indicative of altered higher-order DNA organization as the underlying genetic diathesis in complex neurobehavioural disorders. *Med Hypotheses* 52: 201-208
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acid S* 41: 95-98
- Herr AJ, Jensen MB, Dalmay T, Baulcombe DC (2005) RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* 308: 118-120
- Hirai H, Taguchi T, Godwin AK (1999) Genomic differentiation of 18S ribosomal DNA and β -satellite DNA in the hominoid and its evolutionary aspects. *Chromosome Res* 7: 531-540
- Huang CJ, Huang FL, Wang YC, Hsiao PW, Lo TB (1993) Molecular cloning and relationship of highly repetitive Hind III sequences in three cyprinid species: silver carp, bighead carp and grass carp. *Life Sci* 17: 85-90
- Huang J, Ma L, Yang F, Fei SZ, Li L (2008) 45S rDNA regions are chromosome fragile sites expressed as gaps in vitro on metaphase chromosomes of root-tip meristematic cells in *Lolium* spp. *Plos One* 3: 2167
- Ijdo JW, Wells RA, Baldini A, Reeders ST (1991) Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucl Acid Res* 19: 4780
- Kavalco KF, Pazza R, Bertollo LAC, Moreira-Filho O (2005) Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity* 94: 180-186

- Kidwell MG (2002) Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. *Genetica* 115: 49-63
- Kidwell MG, Lisch D (1997) Transposable elements as sources of variation in animals and plants. *P Natl Acad Sci USA* 94: 7704-7711
- Kilburn AE, Shea MJ, Sargent RG, Wilson JH (2001) Insertion of a telomere repeat sequence into a mammalian gene causes chromosome instability. *Mol Cell Biol* 21: 126-135
- Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201-220
- Long EO, Dawid IB (1980) Repeated genes in eukaryotes. *Annu Rev Biochem* 49: 727-764
- Luehrsen KR, Fox GE (1981) Secondary structure of eukaryotic cytoplasmic 5S ribosomal RNA. *P Natl Acad Sci USA* 78: 2150-2154
- Mariotto S, Centofante L, Vicari M, Artoni R, Moreira-Filho O (2011) Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. *Compar Cytogen* 5: 289-300
- Martins C, Ferreira IA, Oliveira C, Foresti F, Galetti Jr PM (2006) A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. *Genetica* 127: 133-141
- Mathieu O, Jasencakova Z, Vaillant I, Gendrel AV, Colot V, Schubert I, Tourmente S (2003) Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during heterochromatin establishment in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 2929-2939
- Nelson DW, Linning RM, Davison PJ, Honda BM (1998) 5'-flanking sequences required for efficient transcription in vitro of 5S RNA genes, in the related nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. *Gene* 218: 9-16
- Paule MR, White RJ (2000) Survey and summary transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res* 28: 1283-1298
- Pendás AM, Moran P, Freije JP, Garcia-Vazquez E (1994) Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. *Cytogenet Genome Res* 67: 31-36
- Perry J, Slater HR, Choo KA (2004) Centric fission—simple and complex mechanisms. *Chromosome Res* 12: 627-640
- Peterson RC, Doering JL, Brown DD (1980) Characterization of two *Xenopus* somatic 5S DNAs and one minor oocytespecific 5S DNA. *Cell* 20: 131-141
- Pinkel D, Straume T, Gray JW (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *P Natl Acad Sci USA* 83: 2934-2938

- Pontes O, Li CF, Nunes PC, Haag J, Ream T, Vitins A, Pikaard CS (2006) The Arabidopsis chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center. *Cell* 126: 79–92
- Richards RI (2001) Fragile and unstable chromosomes in cancer: causes and consequences. *Trends Genet* 17: 339–345
- Rogers SO, Bendich AJ (1987) Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Mol Biol* 9: 509–520
- Rosa KO, Ziemniczak K, Barros AV, Nogaroto V, Almeida MC, Cestari MM, Vicari MR (2012) Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. *Rev Fish Biol Fisher* 22: 739–749
- Schemberger MO, Oliveira JIN, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Cestari MM, Vicari MR (2014) Construction and characterization of a repetitive DNA library in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): a genomic and evolutionary approach to the degeneration of the W sex chromosome. *Zebrafish* 11: 518–527
- Szczepanski TS, Vicari MR, Almeida MC, Nogaroto V, Artoni RF (2013) Chromosomal Organization of Repetitive DNA in *Sorubim lima* (Teleostei; Pimelodidae). *Cytogenet Genome Res* 141: 309–316
- Slijepcevic P, Hande MP, Bouffler SD, Lansdorp P, Bryant PE (1997) Telomere length, chromatin structure and chromosome fusigenic potential. *Chromosoma* 106: 413–421
- Solovyev VV, Shahmuradov IA, Salamov AA (2010) Identification of promoter regions and regulatory sites. *Methods Mol Biol* 674: 57–83
- Stults DM, Killen MW, Pierce HH, Pierce AJ (2008) Genomic architecture and inheritance of human ribosomal RNA gene clusters. *Genome Res* 18: 13–18
- Sumner AT (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp Cell Res* 75: 304–306
- Sumner AT (2003). *Chromosomes: organization and function*. North Berwick, UK
- Venkateswarlu K, Lee SW, Nazar RN (1991) Conserved upstream sequence elements in plant 5S ribosomal RNA-encoding genes. *Gene* 105: 249–253
- Vicari MR, Nogaroto V, Noleto RB, Cestari MM, Cioffi MB, Almeida MC, Artoni RF (2010) Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. *J Fish Biol* 76: 1094–1116
- Wolffe AP (1994) The role of transcription factors, chromatin structure and DNA replication in 5S RNA gene regulation. *J Cell Sci* 107: 2055–2063
- Ziemniczak K, Barros AV, Rosa KO, Nogaroto V, Almeida MC, Cestari MM, Vicari MR (2012) Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. *Ital J Zool* 79: 492–501

Ziemniczak K, Traldi JB, Nogaroto V, Almeida MC, Artoni RF, Moreira-Filho O, Vicari MR (2014) In situ Localization of (GATA) n and (TTAGGG) n Repeated DNAs and W Sex Chromosome Differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). *Cytogen Genome Res* 144: 325-332

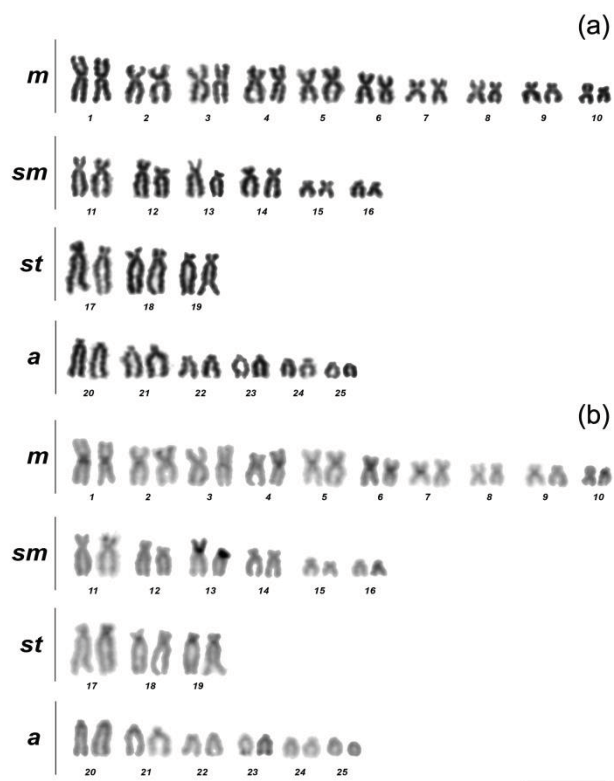


Figura 1. Cariótipo de *Ancistrus* sp. em coloração convencional por Giemsa (a) e bandamento C sequencial (b). Barra = 10 μ m.

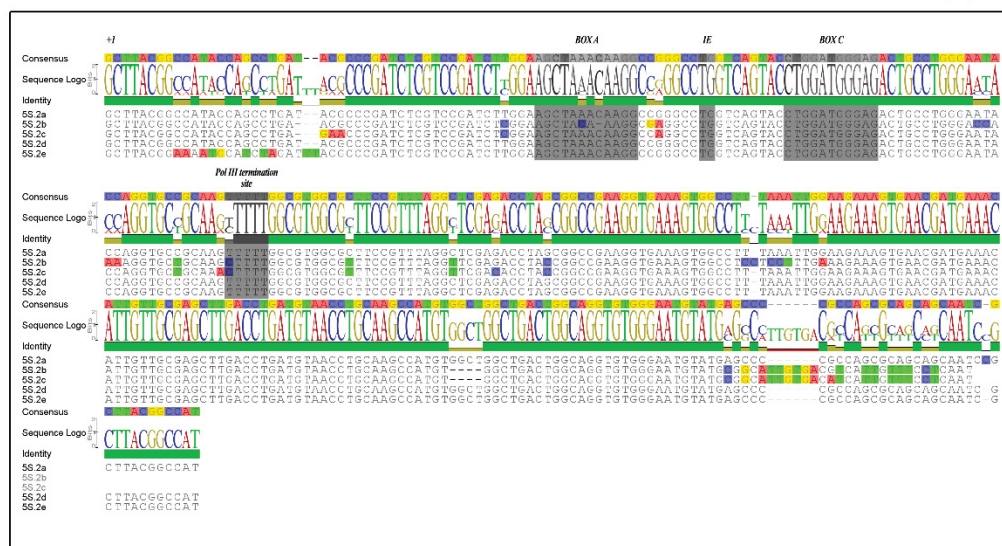


Figura 2. Alinhamentos das sequências rDNA 5S de *Ancistrus* sp. No rDNA 5S.1 (a) são mostradas as sequências TATA-Like, GC box, Citosina -1 na região *upstream* (NTS); sequências Box A, IE, Box C na região 120 nt transcritos e; sequência poli-T (*Pol III termination site*) na região *downstream* (NTS). O rDNA 5S.2 (b) não apresenta as sequências TATA-Like, GC box e Citosina -1 na região *upstream*. As setas evidenciam as regiões de emparelhamentos dos primers. Os SNPs presentes nas sequências estão destacados em cores.

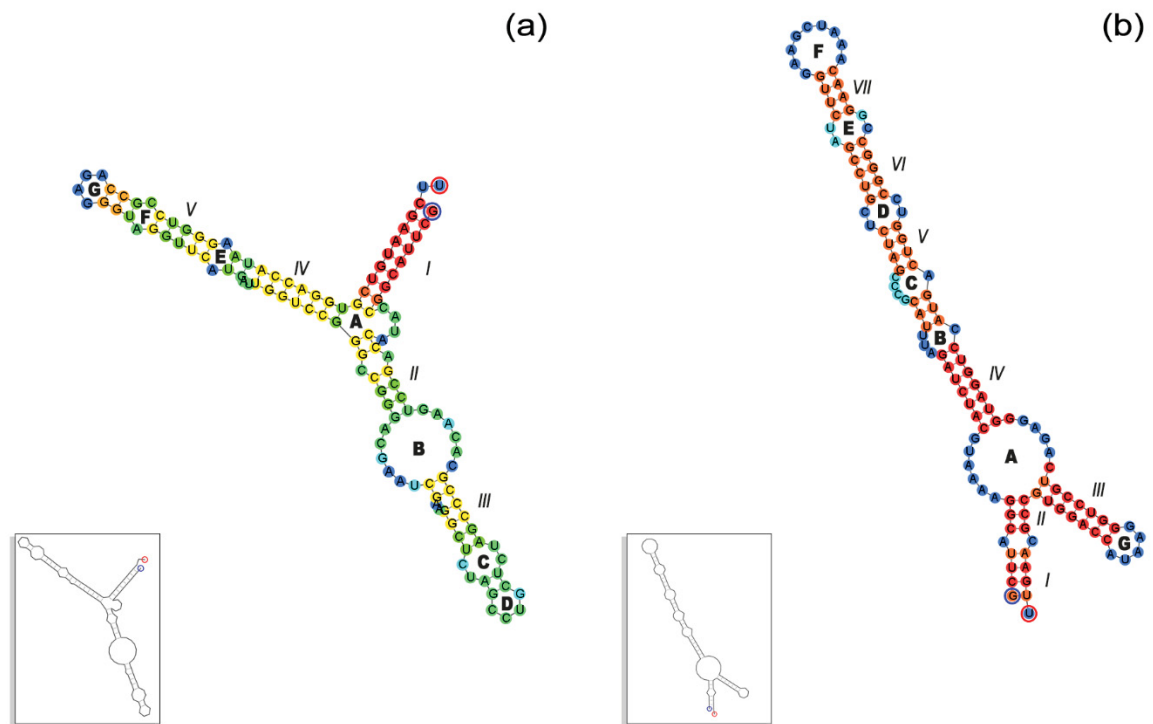


Figura 3. Predição da estrutura secundária dos *rRNA 5S* obtidos de *Ancistrus* sp. Em (a) *rRNA 5S.1* evidenciando organização característica em formato de Y; cinco hélices (I-V); sete *loops* (A-G); *hairpins* internos e externos e uma dobra. Em (b) *rRNA 5S.1* sete hélices (I-VII); sete *loops* (A-G); e uma dobra.

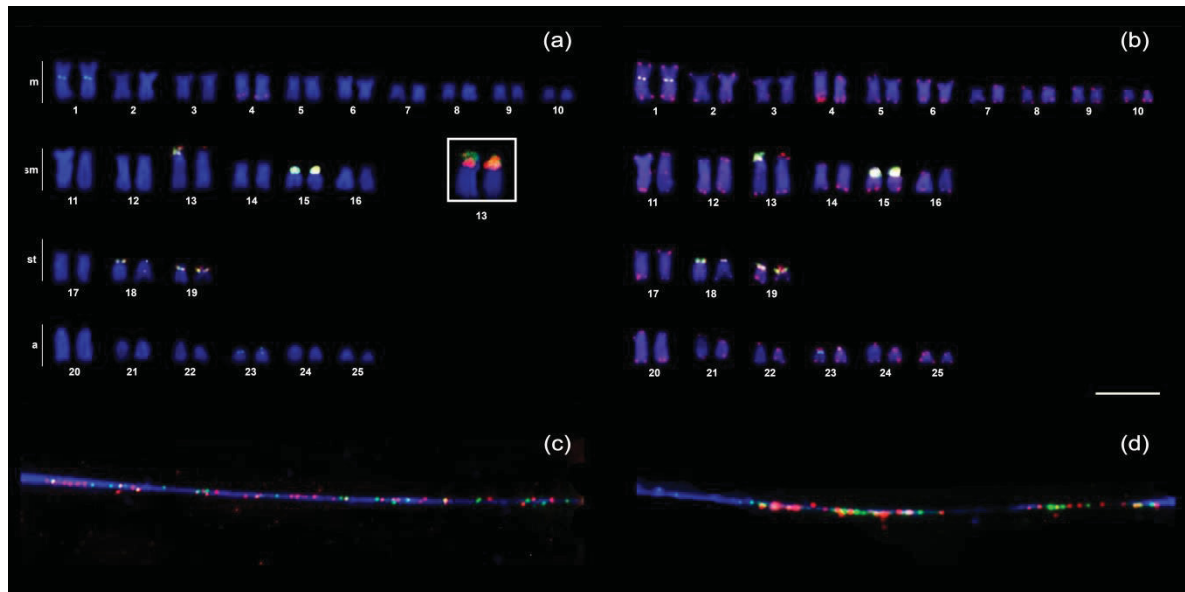


Figura 4. Cariótipos e fibras cromatínicas de *Ancistrus* sp. evidenciando a localização *in situ* das sequências rDNA 5S.1, rDNA 5S.2, rDNA 18S e TTAGGGn. Em (a) dupla hibridação com sondas rDNA 5S.1 (vermelho) e rDNA 5S.2 (verde); em destaque, par portador da sentença rDNA 18S (verde) e rDNA 5S (vermelho). Em (b) dupla hibridação com sondas rDNA 5S.2 (verde) e TTAGGGn (vermelho). Em (c) fibra cromatínica com localização das sequências rDNA 5S.1 (vermelho) e rDNA 5S.2 (verde). Em (d) fibra cromatínica com localização das sequências rDNA 5S.2 (verde) e TTAGGGn (vermelho). Barra = 10 10 μ m.

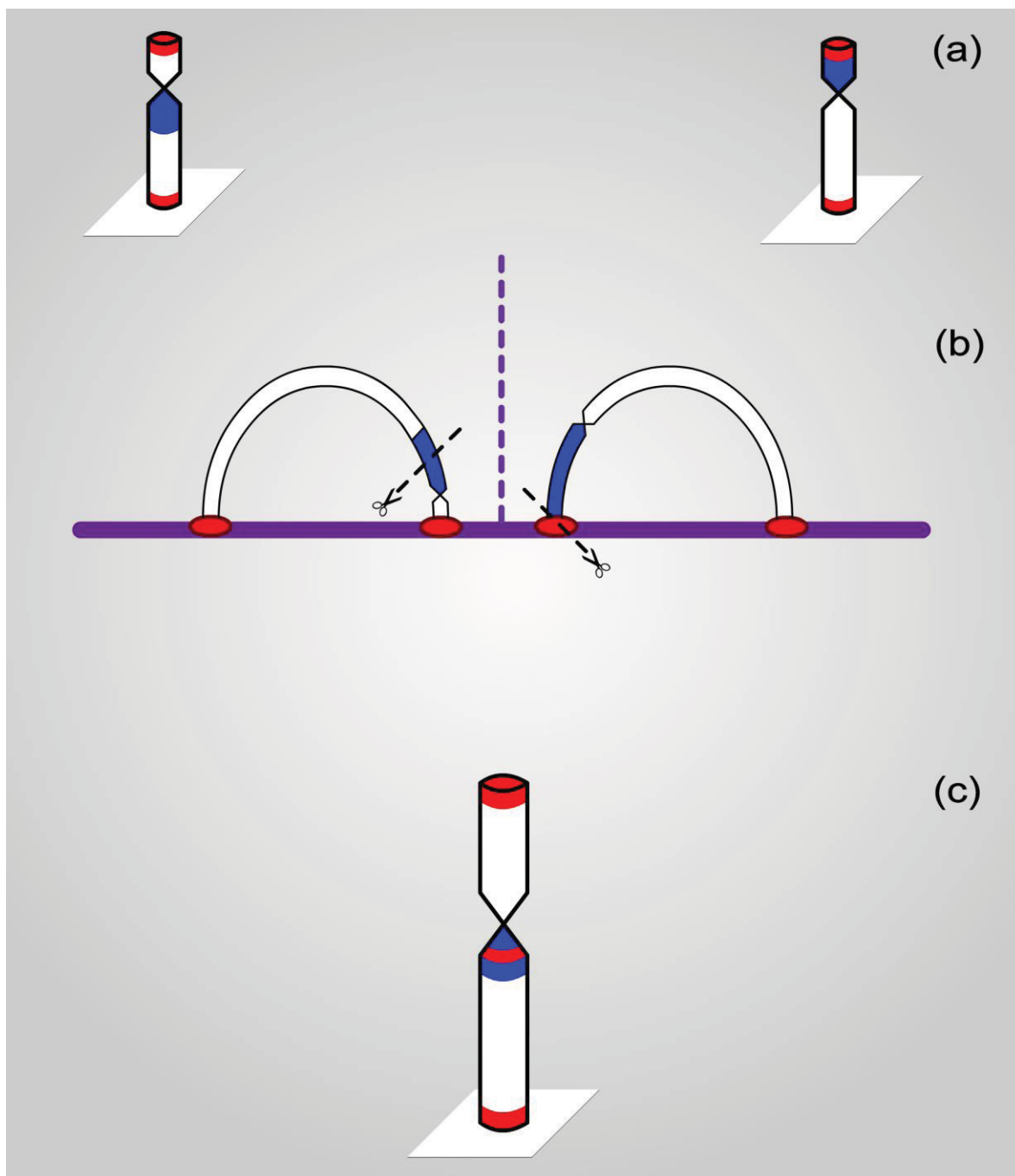


Figura 5. Esquema linear mostrando a hipótese de quebra e fusão Robertsoniana para cromossomos portadores do rDNA 5S.2. Em (a) são mostrados dois idiogramas representativos de cromossomos de *Ancistrus* sp. com a localização das sequências TTAGGGn (vermelho) e rDNA 5S.2 (azul) em regiões proximais de cromossomos acrocêntricos. Em (b) organização em *bouquet* da prófase I mostrando a aproximação do rDNA 5S.2, prováveis sítios de quebra (linha tracejada) para ocorrência da recombinação não homóloga. Em (c) idiograma representativo do par cromossômico 1 de *Ancistrus* sp. com ITS e rDNA 5S.2 proximal.

CAPÍTULO 2

**Citogenética comparativa em *Isbrueckerichthys* (Siluriformes: Loricariidae):
caracteres cromossômicos exclusivos**

RESUMO

Isbrueckerichthys é um gênero de Neoplecostomini que detém cinco espécies descritas e endêmicas para as bacias dos rios Ribeira de Iguape e Tibagi. Dados citogenéticos para Neoplecostomini relatam para estruturas cariotípicas conservadas de $2n = 54$ cromossomos, pouco conteúdo de heterocromatina e, sintonia de rDNAs 45S e 5S. Este estudo procurou avaliar cromossomicamente três espécies de *Isbrueckerichthys*: *I. calvus*, *I. dusei* e *I. saxicola* em seis diferentes pontos de amostragens nas bacias dos rios Ribeira e Tibagi, PR. O número cromossômico de 54 cromossomos foi mantido para as espécies de *Isbrueckerichthys*, corroborando com a proposta de conservação do $2n$ para esta subfamília de Loricariidae. A localização da heterocromatina mostrou uma quantidade de blocos maior para *Isbrueckerichthys* quando comparado com outros gêneros de Neoplecostomini e parece ser uma característica cariotípica derivada para *Isbrueckerichthys*. A localização sintênica dos rDNAs 5S e 45S foi verificada para as espécies deste gênero, a qual é proposta para ser característica cromossômica basal no grupo. No entanto, em *Isbrueckerichthys* ocorre uma inversão na posição destes sítios rDNAs e evidencia mais um rearranjo cromossômico exclusivo para o gênero. Acúmulos *in cis* do rDNA 5S foram verificados nas três espécies de *Isbrueckerichthys* e geraram um heteromorfismo de tamanho deste par cromossômico. Estes dados citogenéticos são discutidos para a organização cariotípica similar em *I. calvus*, *I. dusei* e *I. saxicola*, porém com diferenças exclusivas em relação a outros gêneros do grupo.

Palavras-chave: *Isbrueckerichthys*, acúmulo *in cis*, inversão cromossômica, polimorfismo, FISH

INTRODUÇÃO

A família Loricariidae agrupa o maior e o mais diverso número de espécies da ordem Siluriformes (ESCHMEYER; FRICKE, 2016) e seus dados cariotípicos demonstram uma enorme diversidade de caracteres cromossômicos, no entanto, com algumas tendências de evolução cromossômica bem caracterizadas dentro de cada uma de suas subfamílias (ZIEMNICZAK et al., 2012). O grupo apresenta uma vasta distribuição geográfica, estendendo-se por toda a região Neotropical, abrangendo as Américas: Central e do Sul, desde a Costa Rica até a Argentina (REIS et al., 2003). Estes peixes são recobertos por placas dérmicas, motivo pelo qual são chamados popularmente de cascudos; além disso possuem a boca em forma de ventosa na região ventral do corpo. Vivem na região bentônica, alimentando-se de algas do perifiton e de detritos. Alguns exemplares desta família são apreciados como alimentos e as espécies menores utilizadas para fins ornamentais. Podem ficar fora da água por longos períodos, pois além de respirarem pelas brânquias também o fazem pela parede vascularizada do estômago (REIS et al., 2003).

Isbrueckerichthys foi proposto por Derijst (1996) para incluir as espécies *Pareiorhaphis duseni* e *Pareiorhaphis alipionis*. Três espécies descritas de *Isbrueckerichthys*: *Isbrueckerichthys alipionis* (GOSLINE, 1947), *Isbrueckerichthys duseni* (MIRANDA-RIBEIRO, 1907) e *Isbrueckerichthys epakmos* Pereira & Oyakawa, 2003 eram atribuídas como endêmicas da bacia do rio Ribeira de Iguape. Posteriormente, duas novas espécies, *Isbrueckerichthys calvus* Jerep, Shibatta, Pereira & Oyakawa, 2006 e *Isbrueckerichthys saxicola* Jerep, Shibatta, Pereira & Oyakawa, 2006 foram descritas em subafluentes da bacia do rio Tibagi (Paranapanema, Alto Rio Paraná) e ampliaram na faixa de distribuição geográfica do gênero (JEREP et al., 2006). Espécies deste gênero são distinguidos de outros loricariídeos devido aos caracteres: tamanho corporal pequeno ou médio, pequena área nua atrás do pterótico supracleito, abdômen com pequenas placas embebidas na pele entre o arco peitoral e a base da nadadeira pélvica, nadadeira dorsal com um espinho, sete raios ramificados e pedúnculo caudal ovoide em seção transversal (PEREIRA; OYAKAWA, 2003). *Isbrueckerichthys* sofreu realocações filogenéticas em diferentes subfamílias e gêneros da família Loricariidae. Já estiveram alocados no gênero *Pareiorhaphis* (GOSLINE, 1947) e subfamília Hypostominae (FERRARIS, 2007). Atualmente, *Isbrueckerichthys* compõe entre os Neoplecostomini, que conta com 58 espécies e outros cinco gêneros

Neoplecostomus, *Kronichthys*, *Pareiorhaphis*, *Pareiorhina* e *Pseudotocinclus* (ARMBRUSTER 2004; CHIACHIO; OLIVEIRA; MONTOYA-BURGOS, 2008; ROXO; OLIVEIRA; ZAWADZKI et al. 2012; LUJAN et al., 2015).

Estudos citogenéticos em peixes auxiliam na compreensão de diversos fatores, tais como: no estabelecimento de relações filogenéticas, contribuem com a citotaxonomia de grupos críticos, ajudam na das espécies e, permitem inferências de biologia evolutiva e da diversificação cariotípica nos mais diversos grupos (ARTONI et al., 2009). Dados cromossômicos em Neoplecostomini são escassos e evidenciaram que as espécies desta tribo apresentam um número diploide ($2n$) conservado de 54 cromossomos e poucas modificações estruturais em sua organização cariotípica (ZIEMNICZAK et al., 2012). Em *Isbrueckerichthys*, dados cariotípicos convencionais revelaram a manutenção do $2n = 54$ cromossomos em *I. dusei* (ALVES, 2000; ALVES et al., 2005; ZIEMNICZAK et al., 2012), além de poucos blocos de heterocromatina e sintenia dos DNAs ribossomais 5S e 45S em *I. dusei* (ZIEMNICZAK et al., 2012).

Desta forma, com a lacuna de conhecimento acerca do cariótipo de espécies pertencentes ao gênero *Isbrueckerichthys*, a possibilidade de espécies não descritas e a necessidade de caracteres diagnósticos para a descrição e elucidação sistemática neste gênero, o presente trabalho descreveu e comparou os cariótipos de três espécies *Isbrueckerichthys* em seis pontos de amostragem de tributários das bacias dos rios Tibagi e Ribeira. Assim, no presente trabalho foram analisados os cariótipos de três espécies do gênero: *I. dusei*, *I. saxicola* e *I. calvus*, buscando caracteres cromossômicos diagnósticos entre elas, entender os processos evolutivos que estiveram envolvidos nos processos de diferenciação cariotípica e auxiliar na citototaxonomia de Neoplecostomini.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 10 fêmeas e 10 machos, de cada um dos seis locais de amostragem de *Isbrueckerichthys*, sendo: (1) *I. cf. dusei*, riacho da Areia, Ponta Grossa – PR, (2) *I. dusei*, rio Açungui, Campo Largo – PR, (3) *I. cf. dusei*, rio Itaiacoca, Ponta Grossa – PR, (4) *I. cf. calvus*, rio Charqueada, Ortigueira – PR, (5) *I. calvus*, rio Juruba, Apucarana – PR e; (6) *I. saxicola*, rio Jacutinga, Londrina – PR (Figura 1). A captura das espécies na natureza está em conformidade com a autorização do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (Licença permanente para coleta de material zoológico ICMBio/SISBIO: 15117-1. Os procedimentos de manuseio e bem estar animal estão de acordo com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa e legislação brasileira (Protocolo CEUA: 13/2014).

Os cromossomos mitóticos foram obtidos por meio da técnica de “air drying”, descrita por Bertollo et al. (1978) e o bandamento C seguiu o protocolo proposto por Sumner (1972). As sequências do rDNA 5S e 18S foram sintetizadas como sondas por PCR utilizando como molde DNA nuclear de *I. calvus*. As reações de PCR com primers específicos para cada sequência foi realizada com 20 ng DNA molde, tampão Taq polimerase 1X = 2 mM MgCl₂, 40 μM dATP, dGTP e dCTP, 28 μM de dTTP, 12 μM de digoxigenina 11- dUTP (Roche Applied Science) para o rDNA 18S ou 12 μM biotina 16 dUTP (Roche Applied Science) para o rDNA 5S, 1 μM de cada primer e 1 U de Taq DNA polimerase. A hibridação *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada em condições de estrigência próxima à 82% (2.5 ng/μL de sonda, 50% formamida, 2xSSC e 10% sulfato dextrano por 18 h a 42° C). A detecção do sinal de fluorescência para sondas biotiniladas foi realizada usando streptavidin Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) e para sondas com digoxigenina foi utilizado o composto anti digoxigenina rodamina (Roche Applied Science). Os cromossomos foram contracorados com 0.2 μg mL⁻¹ of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) em meio de montagem Vectashield (Vector, Burlingame, CA, USA).

As hibridizações foram analisadas em microscópio de epifluorescência Zeiss Axio Imager A2 e Câmera Zeiss Axio Cam MRm de Captura Monocromática com sensor CCD e resolução de 1.4 mega pixels acoplado ao software ZEISS pro 2011 (Carl Zeiss®). As imagens foram selecionadas para organizar os cariótipos, onde os cromossomos foram recortados usando o software Adobe Photoshop, versão CS6, e

organizados em pares de homólogos em classes e ordem decrescente de tamanho. Os cromossomos foram classificados em metacêntricos (m), submetacêntricos (sm), subtelocêntricos (st) e acrocêntricos (a) de acordo com Levan et al. (1964).

RESULTADOS

O número diploide observado em todas as populações foi de 54 cromossomos, com fórmula cariotípica constituída por $14m+26sm+14st/a$ e $NF = 108$ (Figura 2). As seis amostragens de *Isbrueckerichthys* evidenciaram uma distribuição de blocos de heterocromatina evidentes em região proximal e equidistante, predominantemente em cromossomos submetacêntricos e subtelo/acrocêntricos, com destaque para o grande bloco heterocromático do par 8, o qual apresenta heteromorfismo de tamanho para exemplares das três populações de *I. dusei* da bacia do rio Ribeira e de *I. calvus* do rio Juruba (Figura 2). Nas espécies *I. cf. calvus* e *I. saxicola* dos rios Charqueada e Jacutinga, respectivamente, apresentaram o de tamanho e a localização bloco heterocromático nos cromossomos do par 12 (Figura 2) (Marcador). A hibridação *in situ* fluorescente evidenciou a localização do sítio de rDNA 5S correspondente ao heteromorfismo de tamanho do bloco heterocromático para o par cromossômico 8 nas três populações de *I. dusei* e na população de *I. calvus* do rio Juruba e, para o par cromossômico 12 em *I. cf. calvus* (Charqueada) e *I. saxicola* (Figura 2, detalhe). O sítio de rDNA 18S se mostrou sintênico e adjacente em posição distal aos sítios do rDNA 5S (Figura 2, detalhe). Os blocos de rDNA 5S evidenciados pela FISH, apresentaram diferentes situações quanto ao tamanho e acúmulo de sequências no cístron: bloco de tamanho grande, médio/pequeno e, ausência de detecção (Figura 2, detalhe).

DISCUSSÃO

Os dados cariotípicos já descritos para Loricariidae demonstram uma enorme diversidade de caracteres cromossômicos apresentando, no entanto, algumas tendências evolutivas bem caracterizadas entre as distintas subfamílias. O número diploide de 54 cromossomos é considerado $2n$ basal putativo em Loricariidae, visto que este número se encontra presente em gêneros basais da família e no grupo irmão da superfamília Loricarioidea, com dados citogenéticos descritos para Trichomycteridae (ARTONI; BERTOLLO, 2001; ZIEMNICZAK et al., 2012). Entre os prováveis grupos basais de Loricariidae (ARMBRUSTER, 2004), os gêneros com dados cariotípicos relatados (*Isbrueckerichthys*, *Kronichthys*, *Pareiorhina*, *Pseudotocinclus* e *Neoplecostomus*) conservam esse número diploide e uma estrutura cariotípica geral similar, incluindo as espécies analisadas neste estudo (Tabela 1). As poucas variações visualizadas na estrutura geral dos cariótipos para *Isbrueckerichthys* corroboram a proposta da estabilidade cromossômica de Neoplecostomini (ALVES et al., 2005; KAVALCO et al., 2005; CENTOFANTE et al., 2011; ZIEMNICZAK et al., 2012). As principais variações cromossômicas descritas estão nas pequenas variações de fórmula cariotípica e localização de blocos heterocromáticos e sítios rDNA 5S e 18S (ZIEMNICZAK et al., 2012).

A ausência de grandes e numerosos blocos de heterocromatina foi considerado um caracter cariotípico plesiomórfico presente em gêneros de Loricariidae com conservação cariotípica e no grupo irmão Trichomycteridae (ZIEMNICZAK et al., 2012). Entre os Neoplecostomini, os grandes blocos heterocromáticos detectáveis estão essencialmente localizados nos cistrons rDNA 5S e 18S (ALVES et al., 2005; KAVALCO et al., 2005; ZIEMNICZAK et al., 2012). Em espécies de *Neoplecostomus*, por exemplo, a heterocromatina é melhor visualizada apenas em dois pares cromossômicos detentores dos cistrons rDNA. As três espécies de *Isbrueckerichthys* deste estudo apresentaram um número maior de blocos heterocromáticos detectáveis, essencialmente em posições equidistantes em relação ao centrômero de alguns pares submetacêntricos e subtelocêntricos. A presença destes blocos diferencia *Isbrueckerichthys* cromossomicamente das espécies de *Neoplecostomus*, *Pareiorhina* e *Kronichthys* (CENTOFANTE et al., 2011; ZIEMNICZAK et al., 2012). De acordo com Schweizer & Loidl (1987) o padrão de bandas de heterocromatina em posição equidistante em relação ao centrômero ocorrem devido à organização cromossômica na

interfase nucleica que facilitaria transposições destes seguimentos. Transposições de sequências repetitivas entre pares cromossômicos foram descritas em Loricariidae pelo mecanismo de recombinação não homóloga (*Non allelic homologous recombination – NAHR*) na origem e espalhamento de blocos de heterocromatina (BARROS et al., 2017; GLUGOSKI, 2017).

O uso da dupla FISH para a localização dos sítios de rDNA foi aplicada em poucas espécies de Neoplecostomini. Essencialmente, *Kronichthys lacerta* e *Isbrueckerichthys dusei* já haviam sido descritos para apresentar sintenia dos rDNAs 5S e 45S, assim como no grupo irmão Trichomycteridae (ZIEMNICZAK et al., 2012). Já algumas espécies de *Neoplecostomus* apresentaram sítios do rDNA 5S em cromossomos diferentes do rDNA 45S (ZIEMNICZAK et al., 2012; DEON, 2017). A variação de tamanho do sítio do rDNA 45 gerando heteromorfismo de tamanho do par cromossômico é relatada em Neoplecostomini (CENTOFANTE et al., 2011; ZIEMNICZAK et al., 2012; DEON, 2017). Em *Isbrueckerichthys* foi observado que a localização dos rDNA 5S e 45S estão em posição invertida quando comparado aos demais Neoplecostomini e Trichomycteridae (CENTOFANTE et al., 2011; ZIEMNICZAK et al., 2012; DEON, 2017). Neste gênero, o rDNA 45S está em posição distal e não apresenta variação acentuada de tamanho dos sítios. No entanto, o rDNA 5S em posição proximal detém acentuada variação do tamanho do sítio em todas as espécies de *Isbrueckerichthys* analisadas neste estudo. Essa variação de tamanho cromossômico atribuída ao rDNA 5S colocalizada ao bloco heterocromático também parece ser uma característica exclusiva de *Isbrueckerichthys*.

Este heteromorfismo de tamanho da heterocromatina/rDNA 5S nos pares cromossômicos polimórficos de *I. calvus*, *I. dusei* e *I. saxicola* é resultado do acúmulo de sequências repetitivas *in cis* causado por erros no pareamento das unidades de repetição do rDNA 5S e crossing-over desigual (GOLD, 1990; PENDÁS et al., 1993; MANTOVANI et al., 2000, VICARI et al., 2008, 2010). O crossing-over desigual entre sequências de DNAs repetitivos já é muito estudado e frequentemente envolve unidades de genes inteiros (WALSH; STEPHAN, 2001). Essa distribuição desigual dos genes dentro dos cromossomos pode ser resultado da deleção da sequência desse gene de uma cromátide e na duplicação do mesmo na outra cromátide, consequentemente aumentando o número de cópias do gene em um cromossomo e diminuindo no outro (SMITH, 1976; SZOSTAK; WU, 1980; WALSH; STEPHAN, 2001). Estes mecanismos tradicionalmente geram um aumento ou diminuição do bloco de heterocromatina

(SMITH, 1976). Em *Isbrueckerichthys*, as ocorrências destes mecanismos podem explicar a intensa variação do tamanho do cistrons heterocromatina/rDNA 5S, onde em alguns casos, o cistron rDNA 5S não é detectado pela FISH em um dos cromossomos do par. Em adição, a observação de apenas 1 cromossomo do par portando rDNAs 5S e 45S em *I. saxicola* indica que eventos de deleção também podem estar atuando na diversificação deste par cromossômico.

As espécies de *Isbrueckerichthys* são diagnosticadas por poucos e sutis caracteres morfológicos (PEREIRA; OYAKAWA, 2003; JEREP et al., 2006). É conhecido que alterações cromossômicas atuam na especiação por prevenir a introgressão gênica (FARIA; NAVARRO, 2010; BARBOSA et al., aceito para publicação). A comparação citogenética realizada neste trabalho não evidenciou variação cariotípica entre as espécies do gênero e, desta forma, a especiação neste grupo de cariótipos similares deve ser melhor investigada por outros mecanismos genéticos. No entanto, a análise cariotípica de *Isbrueckerichthys* demonstrou que as espécies deste gênero possuem divergências cromossômicas em relação aos demais Neoplecostomini, as quais estão correlacionadas principalmente em relação ao maior número de blocos heterocromáticos nos cromossomos e a inversão dos sítios sintênicos de rDNA 5s e 45S quando comparados as demais espécies da tribo. Essas características cromossômicas são exclusivas de *Isbrueckerichthys* e devem estar na base da diversificação do gênero .

Os resultados citogenéticos encontrados para as espécies de *Isbrueckerichthys* das bacias dos rios Ribeira e Tibagi demonstram um 2n conservado e corroboram a proposta de estabilidade cariotípica em Neoplecostomini (ZIEMNICZAK et al., 2012; DEON, 2017). Contudo, as variações observadas quanto aos blocos de heterocromatina, a inversão paracêntrica para a localização sintênica dos rDNAs 5S e 45S e o acúmulo *in cis* do rDNA 5S são exclusivos para as espécies do gênero, tornando-os diferenciados cromossomicamente, até o momento, dos demais Neoplecostomini.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, A. L. (2000). Análise da evolução dos gêneros da subfamília Hemipsilichthiinae (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e de DNA mitocondrial. Unpublished Mastership Dissertation, Universidade Estadual Paulista, Brazil.
- Alves, A. L., Oliveira, C., & Foresti, F. (2005). Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Genetica*, 124(2-3), 127-136.
- Armbruster, J. W. (2004). Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 141(1), 1-80.
- Artoni, R. F., & Carlos Bertollo, L. A. (2001). Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). *Hereditas*, 134(3), 201-210.
- Artoni, R. F., Vicari, M. R., de Almeida, M. C., Moreira-Filho, O., & Bertollo, L. A. C. (2009). Karyotype diversity and fish conservation of southern field from South Brazil. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 19(3), 393.
- Bertollo, L. A. C. (1978). Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). *Revista Brasileira de Genética*, 1, 103-120.
- Centofante, L., Vicari, M. R., Artoni, R. F., Buckup, P. A., Bertollo, L. A. C., & Moreira-Filho, O. (2011). Chromosome analyses in species of *Pareiorhina* (Siluriformes, Loricariidae) and cytotaxonomic considerations on the group. *The Nucleus*, 54(2), 65-70.
- Chiachio, M. C., Oliveira, C., & Montoya-Burgos, J. I. (2008). Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(2), 606-617.
- Eschmeyer, W. N., & Fricke, R. (2016). Catalog of Fishes electronic version.
- Faria, R., & Navarro, A. (2010). Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of evidence. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(11), 660-669.
- Ferraris, C. J. (2007). Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types (pp. 1-628). Auckland, New Zealand: Magnolia Press.

- Gosline, W. A. (1947). Contributions to the Classification of the Loricariid Catfishes. Imprensa Nacional.
- Jerep, F. C. (2006). Cascudos (Loricariidae: Siluriformes) da bacia do médio e baixo rio Paranapanema, alto rio Paraná, Brasil (Doctoral dissertation, Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina, Paraná).
- Kavalco, K. F., Pazza, R., Bertollo, L. A. C., & Moreira-Filho, O. (2005). Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). *Heredity*, 94(2), 180-186.
- Lujan, N. K., Armbruster, J. W., Lovejoy, N. R., & López-Fernández, H. (2015). Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82, 269-288.
- Mantovani, M., dos Santos Abel, L. D., Mestriner, C. A., & Moreira-Filho, O. (2000). Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. *Genetica*, 109(3), 161.
- Miranda-Ribeiro, A. D. (1907). Uma novidade ichthyologica. *Kosmos*, 4(1).
- Pendás, A. M., Morán, P., & Garcia-Vázquez, E. (1993). Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in *Atlantic salmon*. *Cytogenetic and Genome Research*, 63(2), 128-130.
- Pereira, E. H., & Oyakawa, O. T. (2003). *Isbrueckerichthys epakmos*, a new species of loricariid catfish from the rio Ribeira de Iguape basin, Brazil (Teleostei: Siluriformes). *Neotropical Ichthyology*, 1(1), 3-9.
- Reis, R. E., Kullander, S. O., & Ferraris, C. J. (2003). Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs. Derijst, E. (1996). Note on the type species of the mailed catfish genus *Hemipsilichthys* Miranda Ribeiro, 1918 (Pisces: Siluriformes; Loricariidae), with the introduction of *Isbrueckerichthys* nom. nov. *Aquarium Wereld*, 49, 62-64.
- Roxo, F. F., Oliveira, C., & Zawadzki, C. H. (2012). Three new species of *Neoplecostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae) from the upper Rio Paraná basin of southeastern Brazil. *Zootaxa*, 3233(1), 1-21.
- Smith, G. P. (1976). Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science*, 191(4227), 528-535.

- Sumner, A. T. (1972). A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental cell research*, 75(1), 304-306.
- Szostak, J. W., & Wu, R. (1980). Unequal crossing over in the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 284, 426-430.
- Vicari, M. R., Artoni, R. F., Moreira-Filho, O., & Bertollo, L. A. C. (2008). Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janaeensis*. *Cytogenetic and Genome Research*, 122(1), 67-72.
- Walsh, J. B., & Stephan, W. (2001). Multigene families: evolution. eLS.
- Ziemniczak, K., Barros, A. V., Rosa, K. O., Nogaroto, V., Almeida, M. C., Cestari, M. M., & Vicari, M. R. (2012). Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. *Ital J Zool* 79: 492-501.

Tabela 1. Dados cariotípicos para espécies de Neoplecostomini.

Espécie	Local de amostragem	2n	Formula cariotípica	rDNA 18S	rDNA 5S	Ref
<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	Rio Betari, Iporanga (SP)	54	20 m + 20 sm + 14 st	nd	nd	1
<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	Riacho do Areia, Ponta Grossa (PR)	54	20 m + 20 sm + 14 st	Par 8 distal	Par 8 proximal	2, PS
<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	Rio Açungui, Campo Largo (PR)	54	20 m + 20 sm + 14 st	Par 8 distal	Par 8 proximal	2, PS
<i>Isbrueckerichthys duseni</i>	Rio Itaiacoca, Ponta Grossa (PR)	54	20 m + 20 sm + 14 st	Par 8 distal	Par 8 proximal	PS
<i>Isbrueckerichthys cf. calvus</i>	Rio Charqueada, Ortigueira (PR)	54	20 m + 20 sm + 14 st	Par 12 distal	Par 12 proximal	PS
<i>Isbrueckerichthys calvus</i>	Rio Juruba, Apucarana (PR)	54	20 m + 20 sm + 14 st	Par 8 distal	Par 8 proximal	PS
<i>Isbrueckerichthys saxicola</i>	Rio Jacutinga, Londrina (PR)	54	20 m + 20 sm + 14 st	Par 12 distal	Par 12 proximal	PS
<i>Kronichthys heylandi</i>	Rio Betari (SP)	54	50 m/sm + 4 st/a	nd	nd	1
<i>Kronichthys lacerta</i>	Rio Açungui, Campo Largo (PR)	54	22 m + 22 sm + 10 st	Par 23 intersticial	Par 23 distal	2
<i>Neoplecostomus cf. botucatu</i>	Rio Samambaias, Jaguariaíva (PR)	54	18 m + 20 sm + 16 st	Par 10 intersticial	Par 11 distal e par 23 intersticial	3
<i>Neoplecostomus microps</i>	Rio Paraitinga (SP)	54	24 m + 20 sm + 10 st	nd	1 par	4
<i>Neoplecostomus paranensis</i>	Córrego Hortelã (SP)	54	36 m/sm + 18 st/a	nd	nd	1
<i>Neoplecostomus sp. 1</i>	Rio Pinhão, Pinhão (PR)	54	18 m + 20 sm + 16 st	Par 10 intersticial	Par 11 distal e par 23 intersticial	3
<i>Neoplecostomus sp. 2</i>	Rio das Pedras, Ventania (PR)	54	18 m + 20 sm + 16 st	Par 10 intersticial	Par 11 distal e par 23 intersticial	3
<i>Neoplecostomus yapo</i>	Rio São João, Carambeí (PR)	54	18 m + 20 sm + 16 st	Par 10 intersticial	Par 11 distal e par 23 intersticial	3
<i>Neoplecostomus yapo</i>	Rio Verde, bacia do Rio Tibagi (PR)	54	18 m + 20 sm + 16 st	Par 10 intersticial	Par 23 intersticial	3
<i>Pareiorhina brachyrhyncha</i>	Ribeirão Grande, Pindamonhangaba (SP)	54	18 m + 24 sm + 6 st	Par 25 intersticial	nd	5

<i>Pareiorhina rudolphi</i>	Rio Marimbondo, Visconde de Mauá (RJ)	54	18 m + 26 sm + 4 st	Par 11 intersticial	nd	5
<i>Pareiorhina rudolphi</i>	Córrego Grande (SP)	54	48 m/sm + 6 st/a	nd	nd	1
<i>Pseudotocinclus maculicauda</i>	Rio Poço Grande (SP)	54	20 m + 32 sm + 2 st	nd	nd	6
<i>Pseudotocinclus tietensis</i>	Rio Grande (SP)	54	26 m + 20 sm + 8 st	nd	nd	7

2n = número diploide; rDNA 18S = localização do sítio de rDNA 45S; rDNA 5S = localização do sítio de rDNA 5S; Ref = referências: 1 – ALVES et al. (2005); 2 – ZIEMNICZAK et al. (2012); 3 – DEON (2017); 4 – KAVALCO et al. (2005); 5 – CENTOFANTE et al. (2011); 6 – ANDREATA (1991) *in* KAVALCO et al. (2005); 7 – ANDREATA et al. (1992); PS – Presente estudo; ND = não detectado.

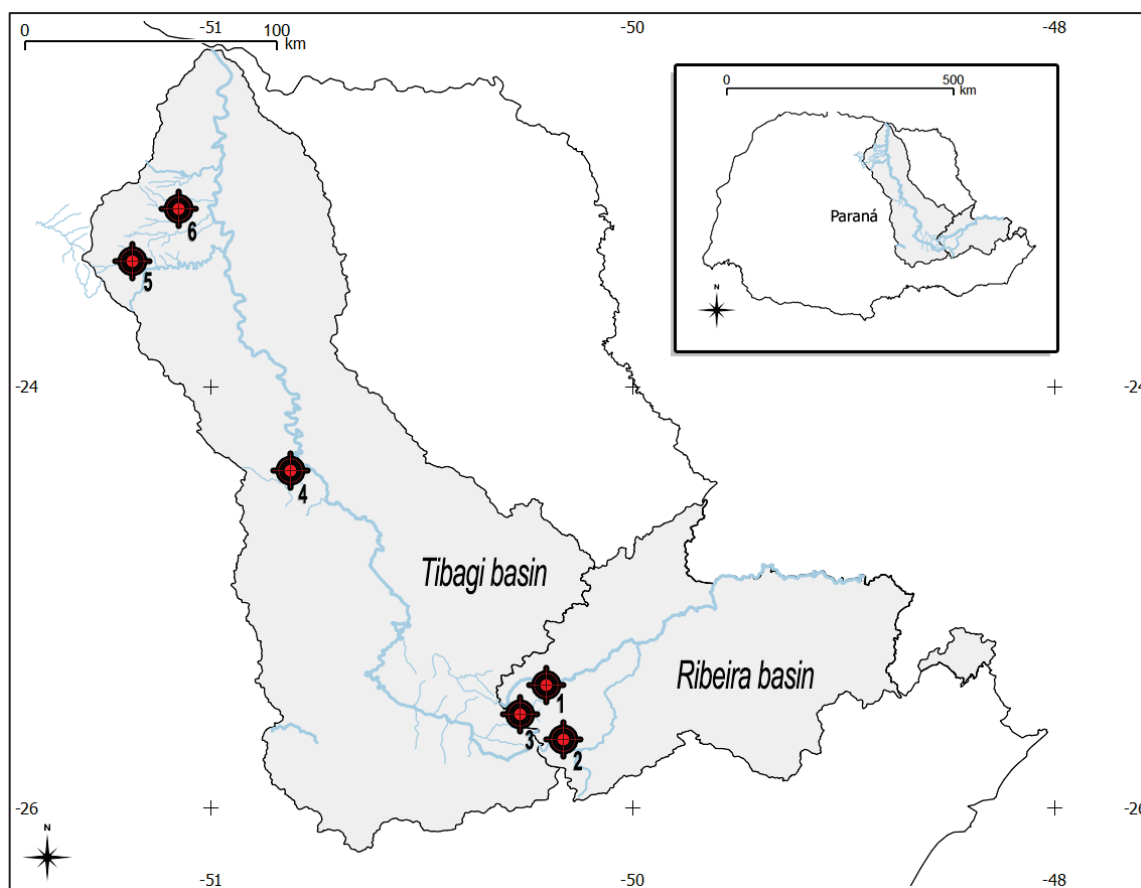


Figura 1. Mapa do estado do Paraná com destaque para as bacias dos rios Tibagi e Ribeira. Riacho da Areia, Ponta Grossa – PR (1), rio Açungui, Campo Largo – PR (2), rio Itaiacoca, Ponta Grossa – PR (3), rio Charqueada, Ortigueira – PR (4), rio Juruba, Apucarana – PR (5) e rio Jacutinga, Londrina – PR (6). (Fonte: <http://www.meioambiente.pr.gov.br/> - Secretaria do Meio Ambiente e Recursos Hídricos - SEMA).

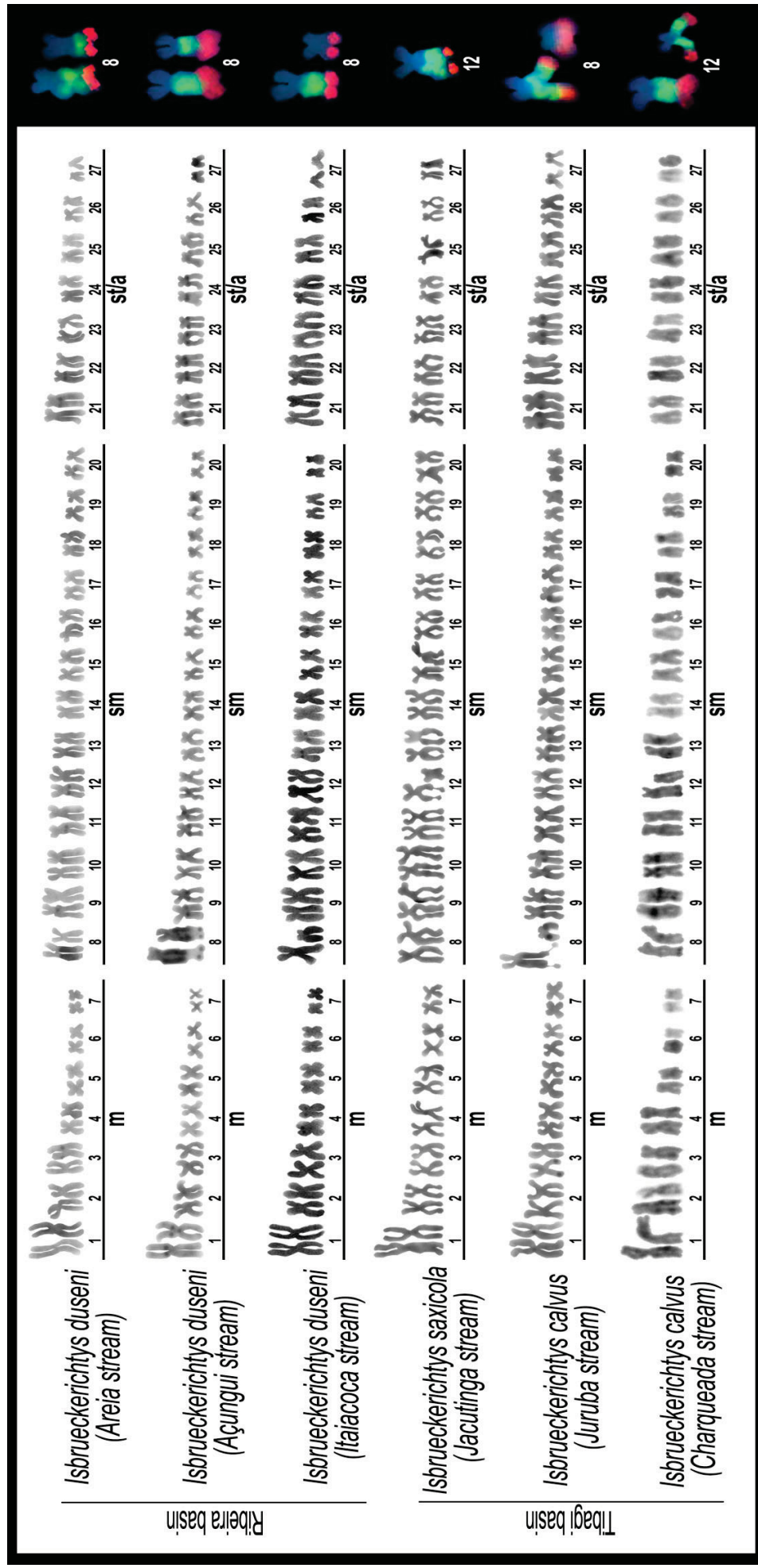


Figura 2. Cariótipos de *Isbrueckerichtys* de seis populações das bacias dos rios Ribeira e Tibagi (esquerda). Destaque da hibridação *in situ* fluorescente, evidenciando os pares portadores das sondas de rDNA 5S (verde) e 18S (vermelho) evidenciando o polimorfismo gerado pelo acúmulo *in cis* de rDNA 5S.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo apresentou as primeiras evidências de genética molecular para sequências pseudogenes do rDNA 5S com envolvimento na formação de sítios frágeis, propensos às quebras e rearranjos cromossômicos no gênero *Ancistrus*.

A caracterização estrutural e funcional do rRNA 5S de *Ancistrus* sp. demonstrou a existência de cópias variantes do RNA ribossômico menor e, que apenas a cópia denominada de *rRNA 5S.1* é funcional neste genoma.

A localização *in situ* das cópias rDNA 5S.1, rDNA 5S.2 e ITS em posição centromérica de um par cromossômico metacêntrico reúne todas as evidências capazes de explicar o rearranjo do tipo fusão Robertsoniana.

Cópias não funcionais do rDNA 5S (rDNA 5S.2) foram descritas para atuar como sítios frágeis para as quebras cromossômicas.

A localização de ITS em *Ancistrus* foi proposto também para atuar como ponto quente para rearranjos cromossômicos no gênero, explicando rearranjos do tipo inversão que são mapeados neste grupo.

Na tribo Neoplecostomini, os marcadores cromossômicos foram localizados em posição conservada, com pouca variação cariotípica, corroborando descrições citogenéticas anteriores no grupo.

Três espécies de *Isbrueckerichthys* tiveram seus cariótipos organizados, os quais se mostraram conservados no gênero, com sintenia dos rDNAs e acúmulos *in cis* do rDNA 5S gerando variação de tamanho e heteromorfismo deste par cromossômico.

Apesar de conservados, os cariótipos de *Isbrueckerichthys* mostraram modificações cromossômicas estruturais do tipo inversão e acúmulo de heterocromatina quando comparados aos demais Neoplecostomini.

Os resultados deste estudo são os primeiros a tentar caracterizar sítios frágeis em Loricariidae. Com os resultados obtidos, parte da ampla variação cariotípica visualizada nesta família pode ser associada aos pontos de quebra do rDNA 5S não funcional, os quais propiciaram fusão Robertsoniana.

6. REFERÊNCIAS

- AKSENOVA, A. Y; GREENWELL, P. W; DOMINSKA, M; SHISHKIN, A. A; KIM, J. C; PETES, T. D; MIRKIN, S. M. Genome rearrangements caused by interstitial telomeric sequences in yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 49, p. 19866-19871, 2013.
- ALVES, A. L; OLIVEIRA, C; FORESTI, F. Karyotype variability in eight species of the subfamilies Loricariinae and Ancistrinae (Teleostei, Siluriformes, Loricariidae). **Caryologia**, v. 56, n. 1, p. 57-63, 2003.
- ALVES, A. L. Análise da evolução dos gêneros da subfamília Hemipsilichthiinae (Ostariophysi, Siluriformes, Loricariidae) com base em caracteres cromossômicos e de DNA mitocondrial. **Unpublished Mastership Dissertation, Universidade Estadual Paulista, Brazil**, 2000.
- ALVES, A. L; OLIVEIRA, C; FORESTI, F. Comparative cytogenetic analysis of eleven species of subfamilies Neoplecostominae and Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Genetica**, v. 124, n. 2-3, p. 127-136, 2005.
- ARMBRUSTER, J. W. Phylogenetic relationships of the suckermouth armoured catfishes (Loricariidae) with emphasis on the Hypostominae and the Ancistrinae. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 141, n. 1, p. 1-80, 2004.
- ARTONI, R. F; BERTOLLO, L. A. C. Nature and distribution of constitutive heterochromatin in fishes, genus *Hypostomus* (Loricariidae). **Genetica**, v. 106, n. 3, p. 209-214, 1999.
- ARTONI, R. F; BERTOLLO, L. A. C. Trends in the karyotype evolution of Loricariidae fish (Siluriformes). **Hereditas**, v. 134, n. 3, p. 201-210, 2001.
- ARTONI, R. F; VICARI, M. R; DE ALMEIDA, M. C; MOREIRA-FILHO, O; BERTOLLO, L. A. C. Karyotype diversity and fish conservation of southern field from South Brazil. **Reviews in fish biology and fisheries**, v. 19, n. 3, p. 393, 2009.
- BADAEVA, E. D; DEDKOVA, O. S; GAY, G; PUKHALSKYI, V. A; ZELENIN, A. V; BERNARD, S; BERNARD, M. Chromosomal rearrangements in wheat: their types and distribution. **Genome**, v. 50, n. 10, p. 907-926, 2007.
- BARROS, A. V; SCZEPANSKI, T. S; CABRERO, J; CAMACHO, J. P. M; VICARI, M. R; ARTONI, R. F. Fiber FISH reveals different patterns of high-resolution physical mapping for repetitive DNA in fish. **Aquaculture**, v. 322, p. 47-50, 2011.
- BERIDZE, T. **Satellite Dna**. Springer, 1986.
- BERTOLLO, L.A.C. Cytotaxonomic considerations on *Hoplias lacerdae* (Pisces, Erythrinidae). **Rev. Bras. Genet**; v. 1, p. 103-120, 1978.

BOLZÁN, A.D. Chromosomal aberrations involving telomeres and interstitial telomeric sequences. **Mutagenesis**, v. 27, n. 1, p. 1-15, 2011.

BRUSCHI, D. P; RIVERA, M; LIMA, A. P; ZÚÑIGA, A. B; RECCO-PIMENTEL, S. M. Interstitial Telomeric Sequences (ITS) and major rDNA mapping reveal insights into the karyotypical evolution of Neotropical leaf frogs species (Phyllomedusa, Hylidae, Anura). **Molecular cytogenetics**, v. 7, n. 1, p. 22, 2014.

BUENO, V; ZAWADZKI, C. H; MARGARIDO, V. P. Trends in chromosome evolution in the genus *Hypostomus* Lacépède, 1803 (Osteichthyes, Loricariidae): a new perspective about the correlation between diploid number and chromosomes types. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 22, n. 1, p. 241-250, 2012.

CAZAUX, B; CATALAN, J; VEYRUNES, F; DOUZERY, E. J; BRITTON-DAVIDIAN, J. Are ribosomal DNA clusters rearrangement hotspots? A case study in the genus *Mus* (Rodentia, Muridae). **BMC evolutionary biology**, v. 11, n. 1, p. 124, 2011.

CENTOFANTE, L; VICARI, M. R; ARTONI, R. F; BUCKUP, P. A; BERTOLLO, L. A. C; MOREIRA-FILHO, O. Chromosome analyses in species of *Pareiorhina* (Siluriformes, Loricariidae) and cytotaxonomic considerations on the group. **The Nucleus**, v. 54, n. 2, p. 65, 2011.

CHARLESWORTH, B; SNIEGOWSKI, P; STEPHAN, W. The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 215, 1994.

CHEN, M. W; ANNE, J; VOLCKAERT, G; HUYSMANS, E; VANDENBERGHE, A; WACHTER, R. D. The nucleotide sequences of the 5 S rRNAs of seven molds and a yeast and their use in studying ascomycete phylogeny. **Nucleic acids research**, v. 12, n. 12, p. 4881-4892, 1984.

CHIACHIO, M. C; OLIVEIRA, C; & MONTROYA-BURGOS, J. I. Molecular systematic and historical biogeography of the armored Neotropical catfishes Hypoptopomatinae and Neoplecostominae (Siluriformes: Loricariidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, n. 2, p. 606-617, 2008.

CIGANDA, M; WILLIAMS, N. Eukaryotic 5S rRNA biogenesis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 2, n. 4, p. 523-533, 2011.

CLOIX, C; TUTOIS, S; MATHIEU, O; CUVILLIER, C; ESPAGNOL, M. C; PICARD, G; TOURMENTE, S. Analysis of 5S rDNA arrays in *Arabidopsis thaliana*: physical mapping and chromosome-specific polymorphisms. **Genome research**, v. 10, n. 5, p. 679-690, 2000.

CLOIX, C; TUTOIS, S; YUKAWA, Y; MATHIEU, O; CUVILLIER, C; ESPAGNOL, M. C; TOURMENTE, S. Analysis of the 5S RNA pool in *Arabidopsis thaliana*: RNAs are heterogeneous and only two of the genomic 5S loci produce mature 5S RNA. **Genome research**, v. 12, n. 1, p. 132-144, 2002.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic acids research**, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, 1988.

DATSON, P. M; MURRAY, B. G. Ribosomal DNA locus evolution in *Nemesis*: transposition rather than structural rearrangement as the key mechanism?. **Chromosome Research**, v. 14, n. 8, p. 845-857, 2006.

DAY, J. P; LIMOLI, C. L; MORGAN, W. F. Recombination involving interstitial telomere repeat-like sequences promotes chromosomal instability in Chinese hamster cells. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 2, p. 259-265, 1998.

OLIVEIRA, R. R. D; SOUZA, I. L; VENERE, P. C. Karyotype description of three species of Loricariidae (Siluriformes) and occurrence of the ZZ/ZW sexual system in *Hemiancistrus spilomma* Cardoso & Lucinda, 2003. **Neotropical Ichthyology**, v. 4, n. 1, p. 93-97, 2006.

DERNBURG, A. F. Cytology of telomeres. **Telomere**, p. 295-338, 1995.

DOUET, J; TOURMENTE, S. Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*. **Heredity**, v. 99, n. 1, p. 5, 2007.

DOYLE, J.J. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1990.

DUCROT, C; LEFEBVRE, O; LANDRIEUX, E; GUIROUILH-BARBAT, J; SENTENAC, A; ACKER, J. Reconstitution of the yeast RNA polymerase III transcription system with all recombinant factors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 17, p. 11685-11692, 2006.

ERRERO-PORTO, F; DE ROSSI VIEIRA, M. M; BARBOSA, L. M; BORIN-CARVALHO, L. A; VICARI, M. R; DE BRITO PORTELA-CASTRO, A. L; MARTINS-SANTOS, I. C. Chromosomal polymorphism in *Rineloricaria lanceolata* Günther, 1868 (Loricariidae: Loricariinae) of the Paraguay Basin (Mato Grosso do Sul, Brazil): evidence of fusions and their consequences in the population. **Zebrafish**, v. 11, n. 4, p. 318-324, 2014.

ESCHMEYER, W. N; FRICKE, R; VAN DER LAAN, R. Catalog of fishes: genera, species, references. **Electronic version accessed**, v. 19, 2016.

FARIA, R; NAVARRO, A. Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of evidence. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 25, n. 11, p. 660-669, 2010.

FAVARATO, R. M; DA SILVA, M; DE OLIVEIRA, R. R; ARTONI, R. F; FELDBERG, E; MATOSO, D. A. Cytogenetic diversity and the evolutionary dynamics of rDNA genes and telomeric sequences in the *Ancistrus* genus (Loricariidae: Ancistrini). **Zebrafish**, v. 13, n. 2, p. 103-111, 2016.

FERRARIS, C.J. **Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes: Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types**. Auckland, New Zealand: Magnolia Press, 2007.

FERREIRA, I. A; OLIVEIRA, C; VENERE, P. C; GALETTI, P. M; MARTINS, C. 5S rDNA variation and its phylogenetic inference in the genus *Leporinus* (Characiformes: Anostomidae). **Genetica**, v. 129, n. 3, p. 253-257, 2007.

GERICKE, G. S. Chromosomal fragility may be indicative of altered higher-order DNA organization as the underlying genetic diathesis in complex neurobehavioural disorders. **Medical hypotheses**, v. 52, n. 3, p. 201-208, 1999.

GOSLINE, W. A. **Contributions to the Classification of the Loricariid Catfishes**. Imprensa Nacional, 1947.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000, p. 95-98, 1999.

HERR, A. J; JENSEN, M. B; DALMAY, T; BAULCOMBE, D. C. RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. **Science**, v. 308, n. 5718, p. 118-120, 2005.

HIRAI, H; TAGUCHI, T; GODWIN, A. K. Genomic differentiation of 18S ribosomal DNA and β -satellite DNA in the hominoid and its evolutionary aspects. **Chromosome Research**, v. 7, n. 7, p. 531-540, 1999.

HUANG, C. J; HUANG, F. L; WANG, Y. C; HSIAO, P. W; LO, T. B. Molecular cloning and relationship of highly repetitive Hind III sequences in three cyprinid species: silver carp, bighead carp and grass carp. **Proceedings of the National Science Council, Republic of China. Part B, Life sciences**, v. 17, n. 3, p. 85-90, 1993.

HUANG, J; MA, L; YANG, F; FEI, S. Z; LI, L. 45S rDNA regions are chromosome fragile sites expressed as gaps in vitro on metaphase chromosomes of root-tip meristematic cells in *Lolium* spp. **PLoS One**, v. 3, n. 5, p. e2167, 2008.

IJDO, J. W; WELLS, R. A; BALDINI, A; REEDERS, S. T. Improved telomere detection using a telomere repeat probe (TTAGGG)_n generated by PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 17, p. 4780, 1991.

JEREP, F. C. **Cascudos (Loricariidae: Siluriformes) da bacia do médio e baixo rio Paranapanema, alto rio Paraná, Brasil**. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina, Paraná, 2006.

KAVALCO, K. F; PAZZA, R; BERTOLLO, L. A. C; MOREIRA-FILHO, O. Karyotypic diversity and evolution of Loricariidae (Pisces, Siluriformes). **Heredity**, v. 94, n. 2, p. 180, 2005.

KIDWELL, M. G; LISCH, D. Transposable elements as sources of variation in animals and plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 15, p. 7704-7711, 1997.

KIDWELL, M. G. Transposable elements and the evolution of genome size in eukaryotes. **Genetica**, v. 115, n. 1, p. 49-63, 2002.

KILBURN, A. E; SHEA, M. J; SARGENT, R. G; WILSON, J. H. Insertion of a telomere repeat sequence into a mammalian gene causes chromosome instability. **Molecular and cellular biology**, v. 21, n. 1, p. 126-135, 2001.

LEVAN, A; FREDGA, K; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, n. 2, p. 201-220, 1964.

LONG, E. O; DAWID, I. B. Repeated genes in eukaryotes. **Annual review of biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 727-764, 1980.

LUEHRSEN, K. R; FOX, G. E. Secondary structure of eukaryotic cytoplasmic 5S ribosomal RNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 4, p. 2150-2154, 1981.

LUJAN, N. K; ARMBRUSTER, J. W; LOVEJOY, N. R; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H. Multilocus molecular phylogeny of the suckermouth armored catfishes (Siluriformes: Loricariidae) with a focus on subfamily Hypostominae. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 82, p. 269-288, 2015.

MANTOVANI, M; DOS SANTOS ABEL, L. D; MESTRINER, C. A; MOREIRA-FILHO, O. Accentuated polymorphism of heterochromatin and nucleolar organizer regions in *Astyanax scabripinnis* (Pisces, Characidae): tools for understanding karyotypic evolution. **Genetica**, v. 109, n. 3, p. 161, 2000.

MARIOTTO, S; CENTOFANTE, L; VICARI, M. R; ARTONI, R. F; MOREIRA-FILHO, O. Chromosomal diversification in ribosomal DNA sites in *Ancistrus* Kner, 1854 (Loricariidae, Ancistrini) from three hydrographic basins of Mato Grosso, Brazil. **Comparative Cytogenetics**, v. 5, n. 4, p. 289, 2011.

MARTINS, C; FERREIRA, I. A; OLIVEIRA, C; FORESTI, F; GALETTI, P. M. A tandemly repetitive centromeric DNA sequence of the fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes: Erythrinidae) is derived from 5S rDNA. **Genetica**, v. 127, n. 1-3, p. 133, 2006.

MARTINS, C. Chromosomes and repetitive DNAs: a contribution to the knowledge of fish genome. **Fish cytogenetics**, p. 421-453, 2007.

MATHIEU, O., JASENCAKOVA, Z; VAILLANT, I; GENDREL, A. V; COLOT, V; SCHUBERT, I; TOURMENTE, S. Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during heterochromatin establishment in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 15, n. 12, p. 2929-2939, 2003.

MIRANDA-RIBEIRO, A. D. Uma novidade ichthyologica. **Kosmos**, 1907.

MURAKAMI, M; FUJITANI, H. Characterization of repetitive DNA sequences carrying 5S rDNA of the triploid gimbuna (Japanese silver crucian carp, *Carassius auratus langsdorfi*). **Genes & genetic systems**, v. 73, n. 1, p. 9-20, 1998.

NELSON, D. W; LINNING, R. M; DAVISON, P. J; HONDA, B. M. 5'-flanking sequences required for efficient transcription in vitro of 5S RNA genes, in the related nematodes *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. **Gene**, v. 218, n. 1, p. 9-16, 1998.

PAULE, M. R; WHITE, R. J. Survey and summary transcription by RNA polymerases I and III. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 6, p. 1283-1298, 2000.

PENDÁS, A. M; MORÁN, P; GARCIA-VÁZQUEZ, E. Ribosomal RNA genes are interspersed throughout a heterochromatic chromosome arm in Atlantic salmon. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 63, n. 2, p. 128-130, 1993.

PENDÁS, A. M; MORAN, P; FREIJE, J. P; GARCIA-VAZQUEZ, E. Chromosomal mapping and nucleotide sequence of two tandem repeats of Atlantic salmon 5S rDNA. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 67, n. 1, p. 31-36, 1994.

PEREIRA, E. H. L; OYAKAWA, O. T. *Isbrueckerichthys epakmos*, a new species of loricariid catfish from the rio Ribeira de Iguape basin, Brazil (Teleostei: Siluriformes). **Neotropical Ichthyology**, v. 1, n. 1, p. 3-9, 2003.

PERRY, J; SLATER, H. R; CHOO, K. H. A. Centric fission—simple and complex mechanisms. **Chromosome Research**, v. 12, n. 6, p. 627-640, 2004.

PETERSON, R. C; DOERING, J. L; BROWN, D. D. Characterization of two *Xenopus* somatic 5S DNAs and one minor oocyte-specific 5S DNA. **Cell**, v. 20, n. 1, p. 131-141, 1980.

PINKEL, D; STRAUME, T; GRAY, J. W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 9, p. 2934-2938, 1986.

PONTES, O; LI, C. F; NUNES, P. C; HAAG, J; REAM, T; VITINS, A; PIKAARD, C. S. The *Arabidopsis* chromatin-modifying nuclear siRNA pathway involves a nucleolar RNA processing center. **Cell**, v. 126, n. 1, p. 79-92, 2006.

REIS, R. E; KULLANDER, S. O; FERRARIS, C. J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Edipucrs, 2003.

RICHARDS, R. I. Fragile and unstable chromosomes in cancer: causes and consequences. **TRENDS in Genetics**, v. 17, n. 6, p. 339-345, 2001.

ROGERS, S. O; BENDICH, A. J. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. **Plant Molecular Biology**, v. 9, n. 5, p. 509-520, 1987.

ROSA, K. O; ZIEMNICZAK, K; BARROS, A. V; NOGAROTO, V; ALMEIDA, M. C; CESTARI, M. M; VICARI, M. R. Numeric and structural chromosome polymorphism in *Rineloricaria lima* (Siluriformes: Loricariidae): fusion points carrying 5S rDNA or telomere sequence vestiges. **Reviews in fish biology and fisheries**, v. 22, n. 3, p. 739-749, 2012.

ROXO, F. F; OLIVEIRA, C; ZAWADZKI, C. H. Three new species of *Neoplecostomus* (Teleostei: Siluriformes: Loricariidae) from the upper Rio Paraná basin of southeastern Brazil. **Zootaxa**, v. 3233, n. 1, p. 1-21, 2012.

SCHEMBERGER, M. O; OLIVEIRA, J. I. N; NOGAROTO, V; ALMEIDA, M. C; ARTONI, R. F; CESTARI, M. M; VICARI, M. R. Construction and characterization of a repetitive DNA library in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes): a genomic and evolutionary approach to the degeneration of the W sex chromosome. **Zebrafish**, v. 11, n. 6, p. 518-527, 2014.

SCZEPANSKI, T. S; VICARI, M. R; DE ALMEIDA, M. C; NOGAROTO, V; ARTONI, R. F. Chromosomal organization of repetitive DNA in *Sorubim lima* (Teleostei; Pimelodidae). **Cytogenetic and genome research**, v. 141, n. 4, p. 309-316, 2013.

SLIJEPCEVIC, P; HANDE, M. P; BOUFFLER, S. D; LANSDORP, P; BRYANT, P. E. Telomere length, chromatin structure and chromosome fusigenic potential. **Chromosoma**, v. 106, n. 7, p. 413-421, 1997.

SMITH, G. P. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. **Science**, v. 191, n. 4227, p. 528-535, 1976.

SOLOVYEV, V. V; SHAHMURADOV, I. A; SALAMOV, A. A. Identification of promoter regions and regulatory sites. In: **Computational biology of transcription factor binding**. Humana Press, Totowa, p. 57-83, 2010.

STULTS, D. M; KILLEN, M. W; PIERCE, H. H; PIERCE, A. J. Genomic architecture and inheritance of human ribosomal RNA gene clusters. **Genome research**, v. 18, n. 1, p. 13-18, 2008.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental cell research**, v. 75, n. 1, p. 304-306, 1972.

SUMNER, A. T. **Chromosomes: organization and function**. North Berwick, UK, 2003.

SZOSTAK, J. W; WU, R. Unequal crossing over in the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. **Nature**, v. 284, n. 5755, p. 426-430, 1980.

VENKATESWARLU, K; LEE, S.W; NAZAR, R. N. Conserved upstream sequence elements in plant 5S ribosomal RNA-encoding genes. **Gene**, v. 105, n. 2, p. 249-253, 1991.

VICARI, M. R; ARTONI, R. F; MOREIRA-FILHO, O; BERTOLLO, L. A. C. Colocalization of repetitive DNAs and silencing of major rRNA genes. A case report of the fish *Astyanax janeiroensis*. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 122, n. 1, p. 67-72, 2008.

VICARI, M. R; NOGAROTO, V; NOLETO, R. B; CESTARI, M. M; CIOFFI, M. B; ALMEIDA, M. C; ARTONI, R. F. Satellite DNA and chromosomes in Neotropical fishes: methods, applications and perspectives. **Journal of Fish Biology**, v. 76, n. 5, p. 1094-1116, 2010.

WALSH, J. B; STEPHAN, W. Multigene families: evolution. **eLS**, 2001.

WOLFFE, A. P. The role of transcription factors, chromatin structure and DNA replication in 5 S RNA gene regulation. **Journal of cell science**, v. 107, n. 8, p. 2055-2063, 1994.

ZIEMNICZAK, K; BARROS, A. V; ROSA, K. O; NOGAROTO, V; ALMEIDA, M. C; CESTARI, M. M; VICARI, M. R. Comparative cytogenetics of Loricariidae (Actinopterygii: Siluriformes): emphasis in Neoplecostominae and Hypoptopomatinae. **Italian Journal of Zoology**, v. 79, n. 4, p. 492-501, 2012.

ZIEMNICZAK, K; TRALDI, J. B; NOGAROTO, V; ALMEIDA, M. C; ARTONI, R. F; MOREIRA-FILHO, O; & VICARI, M. R. In situ localization of (GATA) n and (TTAGGG) n repeated DNAs and W sex chromosome differentiation in Parodontidae (Actinopterygii: Characiformes). **Cytogenetic and genome research**, v. 144, n. 4, p. 325-332, 2014.

7. ANEXOS

Anexo 1 - Barros, A. V., Wolski, M. A. V., Nogaroto, V., Almeida, M. C., Moreira-Filho, O., & Vicari, M. R. (2017). Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: What is 5S rDNA role?. Gene, 608, 20-27.

Gene 608 (2017) 20–27

Contents lists available at ScienceDirect

Gene

journal homepage: www.elsevier.com/locate/gene

Research paper

Fragile sites, dysfunctional telomere and chromosome fusions: What is 5S rDNA role?

Alain Victor Barros^a, Michele Andressa Vier Wolski^a, Viviane Nogaroto^b, Mara Cristina Almeida^b, Orlando Moreira-Filho^c, Marcelo Ricardo Vicari^{a,b,*}

^a Department of Genetics, Federal University of Paraná, Curitiba, Paraná, Brazil
^b Department of Structural Biology, Molecular and Genetics, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, Paraná, Brazil
^c Department of Genetics and Evolution, Federal University of São Carlos, São Carlos, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 22 November 2016
 Received in revised form 4 January 2017
 Accepted 18 January 2017
 Available online 19 January 2017

Keywords:
 Robertsonian fusion
 Telomeric instability
 5S rDNA structure
 Pseudogene
 FISH

ABSTRACT

Repetitive DNA regions are known as fragile chromosomal sites which present a high flexibility and low stability. Our focus was characterize fragile sites in 5S rDNA regions. The *Ancistrus* sp. species shows a diploid number of 50 and an indicative Robertsonian fusion at chromosomal pair 1. Two sequences of 5S rDNA were identified: 5S.1 rDNA and 5S.2 rDNA. The first sequence gathers the necessary structures to gene expression and shows a functional secondary structure prediction. Otherwise, the 5S.2 rDNA sequence does not contain the upstream sequences that are required to expression, furthermore its structure prediction reveals a nonfunctional ribosomal RNA. The chromosomal mapping revealed several 5S.1 and 5S.2 rDNA clusters. In addition, the 5S.2 rDNA clusters were found in acrocentric and metacentric chromosomes proximal regions. The pair 1 5S.2 rDNA cluster is co-located with interstitial telomeric sites (ITS). Our results indicate that its clusters are hotspots to chromosomal breaks. During the meiotic prophase bouquet arrangement, double strand breaks (DSBs) at proximal 5S.2 rDNA of acrocentric chromosomes could lead to homologous and non-homologous repair mechanisms as Robertsonian fusions. Still, ITS sites provides chromosomal instability, resulting in telomeric recombination via TRF2 shelterin protein and a series of breakage-fusion-bridge cycles. Our proposal is that 5S rDNA derived sequences, act as chromosomal fragile sites in association with some chromosomal rearrangements of *Loricariidae*.
 © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Chromosomes rearrangements are currently associated with breaks in highly repetitive DNA sites affecting the chromosomal plasticity and reflecting in speciation (Kidwell and Lisch, 1997; Badaeva et al., 2007; Bruschi et al., 2014; Ziemniczak et al., 2014; Schemberger et al., 2016; Schubert and Vu, 2016). This predisposition of certain genomic regions to instability has been formalized as the “fragile breakage model” (Pevzner and Tesler, 2003). Along with this model, the break propensity

of interstitial telomeric sites (ITS) and telomere dysfunction are also used to explain chromosome plasticity (Kilburn et al., 2001; Ruiz-Herrera et al., 2008; Bolzán, 2012; Slijepcevic, 2016). In mammals, mainly, sequences as long terminal repeat (LTR), long interspaced nuclear element (LINE) and short interspaced nuclear element (SINE) were found in fragile sites, which are known for compose a high flexibility/low stability DNA region (Eichler and Sankoff, 2003).

The main function of telomeres is grant stability to linear chromosomes ends. This is known as the capping function which prevents broken DNA ends from being targeted by repair mechanisms (De Lange, 2004). The other function of telomeres is to settle the end replication problem (De Lange, 2015). In some cases, traces of telomeric sequences (TTAGGG_n) are found in interstitial sites, where is observed a high occurrence of chromosome rearrangements (Meyne et al., 1990; Ruiz-Herrera et al., 2008). ITS are hotspots for chromosomal breakage (Slijepcevic et al., 1997) and recent studies show that telomeric DNA damages can be irreparable, causing persistent DNA-damage-response activation (Fumagalli et al., 2012) or remaining as fragile sites (Sfeir et al., 2009). This evidence suggests that both ITS and terminal telomeric sequences are naturally prone to breakage, leading to chromosome plasticity (Slijepcevic, 2016).

Abbreviations: 5S rDNA, 5S ribosomal DNA; 5S rRNA, 5S ribosomal RNA; a, acrocentric; DSBs, double strand breaks; FISH, fluorescence in situ hybridization; ITS, interstitial telomeric sites; LINE, long interspaced nuclear element; LTR, long terminal repeat; m, metacentric; NTS, non-transcribed space; PCR, polymerase chain reaction; RPS5, 5S rDNA homologous to 5S rDNA; SINE, short interspaced nuclear element; sm, submetacentric; SNPs, single nucleotide polymorphisms; st, subtelocentric; TEs, transposable elements.

* Corresponding author at: Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Av. Carlos Cavalcanti, 4748, 84030-900 Ponta Grossa, Paraná State, Brazil.

E-mail address: vicarimr@pq.cnpq.br (M.R. Vicari).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2017.01.013>
 0378-4119/© 2017 Elsevier B.V. All rights reserved.